



© 2000 by the American Society of Hematology. All rights reserved.

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplombiologin Irina Idler
aus Rettersburg

Tag der mündlichen Prüfung: 2/11/04

Untersuchungen zur zellulären und humoralen Immunantwort
gegen das Merozoitenoberflächenprotein-1
des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*

Gutachter: Prof. Dr. Hermann Bujard
Prof. Dr. Michael Lanzer

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg in der Zeit von Dezember 1999 bis Oktober 2004 unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. Hermann Bujard angefertigt.

Prof. Hermann Bujard Danke ich für das interessante Thema und alle Anregungen bei der Gestaltung und Entwicklung der Forschungsaufgabe. Ich danke Ihm auch dafür, daß er Rahmenbedingungen geschaffen hat, in denen es möglich war Mutter und Wissenschaftlerin gleichzeitig zu sein.

Prof. Dr. Michael Lanzer danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Rammensees Arbeitsgruppe in Tübingen für die fruchtbare Kooperation. Mein Dankeschön richtet sich insbesondere an Priv. Doz. Stefan Stevanovic für seine Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft, seine immunologischen Vorlesungen und für die Elution des MSP-1 Peptids. Ebenso gilt mein Dank Dr. Steve Pascolo und Dipl. Biol. Jean-Philippe Carralot für die ELISPOT Experimente und Dr. Steffen Walter für seine Expertise bei der Tetramer-Technologie.

Dr. Dirk Schlüter und seiner Mitarbeitern möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Kompetenz beim Durchführen des ELISPOT Experimentes in Mannheim danken.

Dr. Thomas Schüler aus Dr. Bernd Arnolds Arbeitsgruppe im DKFZ hat uns im Zusammenhang mit den Maus-Immunisierungsexperimenten Vieles beigebracht. Ich danke ihm für seine seine Hilfsbereitschaft.

Meinen Arbeitskollegen, die mir stets ein anregendes Umfeld boten, danke ich für das gute Arbeitsklima. Insbesondere bedanke ich mich für die Zusammenarbeit bei Dr. Siromi Weerasuryia, Silke Druffel-Augustin, Dr. Nicole Westerfeld und Dr. Jun Miao.

Last-but-not-least bedanke ich mich an dieser Stelle bei meinem Mann Dr. Daniel Mertens, der Partnerschaftlichkeit, Fairness und Toleranz lebt. Meiner Tochter Anouk danke ich dafür, daß jeder Tag auf jeden Fall irgendwann eine schöne Stunde hat.

Zusammenfassung

Summary

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Der Lebenszyklus von Plasmodium falciparum	1
1.1.2	Pathogenese	4
1.1.3	Mechanismen der Immunantwort	4
1.2	Suche nach einem Impfstoff gegen P. falciparum	9
1.2.1	Immunologische Aspekte von Malaria-Impfstoffen	9
1.2.2	Impfstofftypen	11
1.3	Das Merozoitenoberflächenprotein-1: MSP-1	13
1.3.1	MSP-1: Komplex und Prozessierung	13
1.3.2	Struktur	14
1.3.3	Funktion von MSP-1	16
1.3.4	Warum ist MSP-1 ein guter Impfstoffkandidat ?	16
1.4	Ziele der Arbeit	18
2	Abkürzungen und Definitionen	21
2.1	Abkürzungen	21
2.1.1	Einheiten	23
2.1.2	Vorsätze	23
2.1.3	Basen/Nukleoside	23
2.1.4	Nomenklatur der Aminosäuren	23
2.2	Definitionen	24
3	Material	25
3.1	LaboraAusstattung	25
3.2	Verbrauchsmaterialien	26
3.3	Chromatographiemedien	26
3.4	Chemikalien	26
3.5	Enzyme	27
3.6	Seren und Antikörper	27
3.7	Primer	28
3.7.1	Klonierungen	28
3.7.2	Sequenzierungen	28
3.8	Verwendete Plasmide	29
3.9	Bakterienstämme	29
3.10	Verwendete Zelllinien	29
3.11	Verwendete Mäuse	29
3.12	Material für die Kultur von E.coli	30
3.12.1	Lösungen für die Kultur von E.coli	30
3.12.2	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	30

3.13	Material für die Kultur von Zelllinien	30
3.14	Material für molekularbiologische Methoden	30
3.14.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> Bakterien	30
3.14.2	Reaktionspuffer für Enzyme	31
3.14.3	PCR-Reaktionspuffer	31
3.14.4	Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese von DNA	32
3.14.5	Isolierung von DNA aus Agarose Gelen	32
3.15	Material für biochemische Methoden	32
3.15.1	Luziferase-Assay	32
3.15.2	β -Galaktosidase-Nachweis mit X-Gal	32
3.15.3	β -Galaktosidase-Quantifizierung mit ONPG	32
3.15.4	Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3.15.5	Coomassie-Färbung	32
3.15.6	Silberfärbung nach Heukeshoven (modifiziert)	33
3.15.7	Lösungen für „Western Blot“	34
3.15.8	Lösungen für die In-vitro-Renaturierung von rekombinanten Proteinen	34
3.15.9	Puffer für die chromatographische Reinigung von Proteinen	35
3.16	Material für immunologische Methoden	36
3.16.1	ELISA	36
3.16.2	Herstellung von MHC/Tetrameren	36
3.16.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung	37
3.16.4	ELIspot-Assay	37
4	Methoden	39
4.1	DNA-Transfer in <i>E.coli</i> -Zellen	39
4.1.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für die CaCl_2 Methode	39
4.1.2	Transformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Zellen nach der CaCl_2 -Methode	39
4.1.3	Schnelltransformation von Plasmid-DNA in kompetente <i>E. coli</i> Zellen	39
4.2	Isolierung und Aufreinigung von DNA	39
4.2.1	Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Chromatographie („Plasmid-Miniprep“)	39
4.2.2	Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionen Austausch Chromatographie (‘Maxi-Prep’)	40
4.2.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.2.4	Reinigung von PCR-Produkten aus Lösungen	41
4.2.5	Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen (Phenolextraktion)	41
4.2.6	Konzentrierung von Nukleinsäurellsg (Ethanol-fällung)	41
4.3	Analyse von DNA	42
4.3.1	Photometrische Bestimmung der Konzentration	

	und Reinheit von Nukleinsäurelösungen	42
4.3.2	Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	42
4.4	In vitro Modifikation von DNA	42
4.4.1	Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. entfernen von 3'-überhängenden DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase	42
4.4.2	Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase	43
4.4.3	Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase	43
4.4.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten in der Polymerase-Ketten-Reaktion	43
4.4.5	Einführung ortsspezifischer Nukleotide	44
4.5	Herstellung und Renaturierung rekombinanter MSP-1 Fragmente	45
4.5.1	Expression von msp-1 Fragmenten in E. coli	45
4.5.2	Aufschluss der Bakterienzellen	45
4.5.3	Solubilisierung der Einschlusskörperchen	45
4.5.4	In-vitro-Rückfaltung der Einschlusskörperchen mittels Pulsrenaturierung	45
4.6	Chromatographische Reinigung der rekombinanten MSP-1 Fragmente	46
4.6.1	Ni ²⁺ -Chelat-Chromatographie	46
4.6.2	Gelfiltrationschromatographie	47
4.6.3	Immunaффinitätschromatographie	47
4.6.4	Analyse von Proteinen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophores	47
4.6.5	Färbung von Proteinen in PAA-Gelen	48
4.6.6	Western-Blot	48
4.6.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	49
4.7	Kultivierung von Säugerzellen	49
4.7.1	Wachstum von Zellkulturen	49
4.7.2	Passagieren der Zellen	50
4.7.3	DNA-Transfer in Säugerzellen	51
4.7.4	Quantifizierung von Transfektionsexperimenten	53
4.8	Immunologische Techniken	54
4.8.1	Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)	54
4.8.2	Herstellung von MHC Klasse-I-/Peptid Komplexen	55
4.8.3	Einfrieren und Auftauen von PBMCs	58
4.8.4	Bestimmung der Lebendzellichte: Trypanblaufärbung	58
4.8.5	Aufreinigung von Leukozyten aus der Milz	59
4.8.6	Stimulierung von Lymphozyten und Färbung von intrazellulären Zytokinen	59
4.8.7	ELISpot	59
4.8.8	Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer	60

5	Ergebnisse	61
5.1	Humorale Immunantwort gegen MSP-1 bei malaria-exponierten Personen	61
5.1.1	Aufreinigung von MSP-1F Fragmenten aus E.coli	61
5.1.2	Analyse der MSP-1F spezifischen Antikörpertiter in afrikanischen Seren	65
5.2	Identifizierung von MSP-1 CD8+ T-Zell Epitopen	69
5.2.1	Etablierung einer msp-1 exprimierenden Zelllinie für die physiologische Peptidselektion	69
5.2.2	Vorhersage von HLA-A*0201 spezifischen Epitopen in MSP-1	80
5.3	Etablierung der Tetramer-Technologie zur quantitativen Erfassung epitopspezifischer T-Zellen	86
5.3.1	Herstellung funktioneller Tetramere	86
5.3.2	Identifizierung MSP-1-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels Tetramer-Anfärbung	93
6	Diskussion	99
6.1	Nachweis MSP-1 spezifischer Antikörper in menschlichen Seren gegen MSP-1 Prozessierungsprodukte	99
6.1.1	Immunogenität der verschiedenen Proteinfragmente	100
6.2	Charakterisierung von CD8+ T-Zell-Epitopen in MSP-1	102
6.2.1	Wie und wo werden zytotoxische T-Zellen gegen MSP-1 Peptide aktiviert?	102
6.3	Zwei Strategien zur Identifikation von CTL-Epitopen	103
6.3.1	Zelllinien: Identifiziertes CD8+ T-Zell Epitop MSP-1	103
6.3.2	Peptid-Vorhersage: Identifizierte CD8+ T-Zell Epitope in MSP-1	105
6.3.3	Unterschiede in der Epitop-Hierarchie bei immunisierten HHD-2 Mäusen und malariaexponierten Menschen	107
6.3.4	Epitop-Lokalisation und Implikationen für die Impfstoffentwicklung	108
6.4	Ausblick	110
6.4.1	Experimentelle Möglichkeiten mit den Kandidatenepitopen	110
6.4.2	Epidemiologische Studien	110
6.4.3	Funktionelle Aktivität und Phänotyp der CD8+ T-Zellen	110
6.5	MSP-1 und Impfstoffdesign	111
7	Literatur	115

Zusammenfassung

Malaria ist mit geschätzten 300-500 Millionen klinischen Fällen jährlich eine der bedrohlichsten Infektionskrankheiten der heutigen Welt. Die Ursache der lebensbedrohlichen Form der Malaria, der Malaria tropica, ist der einzellige Parasit, Plasmodium falciparum. Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen Malaria wäre ein wichtiger Beitrag um die Seuche zu kontrollieren und könnte die Lebenssituation der Menschen in Malaria-verseuchten Gebieten verbessern. Da P. falciparum dem Immunsystem des Menschen sehr effizient angepasst ist, konnte bislang kein effektiver Impfstoff entwickelt werden. In der Malaria-Impfstoffentwicklung wird i.a. nicht mit attenuierten oder abgetöteten Erregern gearbeitet, da der komplette Lebenszyklus bislang nicht in synthetischen Medien zu kultivieren ist. Man fokussiert sich hauptsächlich auf einzelne Proteine oder Teilbereiche von Proteinen, die der Parasit während seines Lebenszyklus dem Immunsystem des Wirts präsentiert. Dabei wurden vielversprechende Kandidaten identifiziert.

In unserer Gruppe konzentrieren wir uns auf das Merozoitenoberflächenprotein-1 (merozoite surface protein 1, MSP-1), das Hauptoberflächenprotein des Blutstadiums von P. falciparum. MSP-1 gilt als einer der interessantesten Impfstoffkandidaten. Für die Entwicklung einer effektiven Impfstoffstrategie ist es wichtig, die Verteilung stark immuno-stimulatorischer Bereiche innerhalb des Proteins zu kennen. Außerdem ist von Interesse, wie die humoralen und zellulären Abwehrsysteme des Immunsystems unter natürlichen Bedingungen, auf MSP-1 reagieren. Die humorale Antwort spielt vor allem bei der Abwehr der Blutstadien eine Rolle, während die zelluläre Reaktion mit der Eliminierung befallener Leberzellen assoziiert wird. Während man weiß, daß die humorale Immunantwort des Menschen durch spezifische Antikörper gegen MSP-1 protektiv wirken kann, ist über die möglicherweise CD8⁺ T-Zell vermittelte zelluläre Antwort gegen MSP-1 nichts bekannt. Um CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, müssen kurze Stücke (meist neun Aminosäuren) in der Grube eines MHC-Klasse-I Rezeptors auf die Oberfläche einer Zelle transportiert werden. Solche Peptide nennt man „Epitope“. Es war das wichtigste Ziel dieser Arbeit, CD8⁺ T-Zellepitope von MSP-1 zu identifizieren, wobei wir nach HLA-A*0201-restringierten T-Zellepitopen suchten. Wir verfolgten zwei Ansätze zur Identifikation von CD8⁺ T-Zellepitopen, die sich gegenseitig ergänzen und verifizieren sollten.

- Eine computergestützte Vorhersage von SYFPEITHI lieferte potentiell an HLA-A*0201 bindende Epitope von MSP-1. Um die in-vivo Relevanz dieser Epitope zu prüfen, wurde ein transgenes Maussystem verwendet, das den humanen HLA-A*0201 Rezeptor exprimiert („HHD-2 Mäuse“) und sich eignet, um verschiedene Impfprotokolle zu testen. MSP-1 Epitop-spezifische CD8⁺ T-Zellen können in MSP-1 immunisierten Mäusen mittels Tetramer-Technologie angefärbt werden. Wir fanden eine Hierarchie der Immundominanz zwischen verschiedenen MSP-1 Epitopen. Das Peptid 291 in der Region p38 von MSP-1 dominierte die Immunantwort und induzierte die größten spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulationen. Bestätigt wurde dieser Befund über intrazelluläre Zytokin (IFN- γ) Anfärbungen Epitop-spezifischer T-Zellen.

- Die zweite Strategie sollte physiologisch präsentierte Peptide von MSP-1 identifizieren und somit die in-vivo Situation in menschlichen Zellen reflektieren. Von einer Tetrazyklin-abhängig MSP-1 exprimierenden HLA-A*0201-positiven Zelllinie wurden HLA-A*0201 präsentierte Peptide eluiert und massenspektrometrisch analysiert. Dabei wurde das Epitop 674, das sich in der Untereinheit p83 von MSP-1 befindet, identifiziert. Die Relevanz dieses Ergebnisses konnte durch erste Tetramer-Analysen an peripheren Lymphozyten von malaria-exponierten Individuen bestätigt werden. Wir fanden immunodominante und häufige CD8⁺ T-Populationen insbesondere gegen Epitope 674 und 291. Andere Epitope wurden ebenfalls erkannt, allerdings mit geringerer Frequenz und von kleineren T-Zellpopulationen.

Summary

With an estimated 300-500 million acute cases annually, Malaria is one of the most threatening infectious diseases of the modern world. The cause of the life-threatening variant, Malaria tropica, is the Protozoon *P. falciparum*. Developing a vaccine against Malaria would be an important step in controlling the disease and would improve life-standards of populations of endemic regions. Since the protozoan parasite has adapted very efficiently to the human immune system, no effective vaccination strategy could be developed up to date. The focus in Malaria vaccine-design is not on attenuated or killed whole *P. falciparum* organisms, as culturing of the complete life-cycle of *Plasmodium* in fully synthetic medium is not possible. Instead, vaccines are developed on the basis of single proteins or parts of proteins that are presented to the host-immunesystem during the parasite lifecycle. Using this strategy, promising candidates were identified.

Our group concentrates on Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1) which is the most abundant surface protein of the blood-stage of *Plasmodium* and thus one of the most promising candidates for a malaria vaccine. For the development of an efficient vaccine, knowledge about the distribution of strong immunostimulatory parts of the molecule is essential. It is also of interest if and how the humoral and cellular arm of the immunesystem target MSP-1 under natural infectious conditions. The humoral arm plays an important role in controlling the blood-stages, whereas the cellular immunereaction is primarily the elimination of *Plasmodium*-infected hepatocytes. The humoral response against MSP-1 can have protective effects, yet nothing is known about the cellular answer of CD8+ cytotoxic T-Lymphocytes against MSP-1. To activate CD8+ T-cells, short peptides (mostly nonamers) derived from MSP-1 protein have to be transported to the cell surface in the groove of an MHC-class-I receptor. Such peptides are called "epitopes". It was the central aim of this thesis to identify such CD8+ T-cell epitopes of MSP-1. We concentrated on HLA-A*0201 restricted epitopes and pursued two experimental strategies to identify CD8+ T-cell epitopes:

- A computer-based prediction using SYFPEITHI programm identified potential HLA-A*0201 binding epitopes in MSP-1. To test the in vivo relevance of these predicted epitopes we used a transgene mouse-system in which the human HLA-A*0201 receptor is expressed (HHD-mice). The HHD-mouse model is an excellent system for testing different vaccination schemes. MSP-1 epitope specific T-cells were fluorescently marked in immunized mice using the tetramer technology. We found a hierarchy of immunodominance between the tested MSP-1 epitopes. Peptide 291 which localizes to the p38 region of MSP-1 dominated the CD8+ immune response in most immunized mice and induced the largest epitope-specific T-cell populations.

- With the second strategy we wanted to identify physiologically presented peptides of MSP-1 reflecting the in-vivo situation in human cells. HLA-A*0201 MSP-1 was tetracyclin-inducibly expressed in a HLA-A*0201+ cellline and the presented physiological epitopes were eluted and analyzed by mass spectrometry. Thereby peptide 674 was identified which localizes in the p83 subunit of MSP-1. This result could be confirmed in first tetramer-analyses on peripheral lymphocytes of malaria-exposed individuals. We found an immunodominance and frequent CD8+ T-cell populations against epitopes 674 and 291. Other epitopes were also recognized, but in lower frequencies and smaller T-cell populations.

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine durch einen einzelligen Blutparasiten verursachte Krankheit, die einstmals auch in Europa verbreitet war. Deutsche Begriffe für die Seuche wie „Marschenfieber, oder Sumpffieber“ bezeugen dies. Während aber für Europäer Malaria lediglich eine Reisekrankheit ist, hat sie auf Menschen aus betroffenen Gebieten immer noch einschneidende gesundheitliche und ökonomische Auswirkungen. Insgesamt kommt der Parasit in über 100 Ländern vor, hauptsächlich beschränkt auf tropische und subtropische Regionen in Afrika, Asien und Süd-Amerika. Nach Schätzungen der WHO erkrankten jährlich 300-500 Millionen Menschen an Malaria, von denen 1,5-2,7 Millionen sterben (WHO; Malaria fact sheet No94; 2004). Über 90% der Todesfälle kommen südlich der Sahara vor, in den meisten Fällen handelt es sich dabei um Kinder unter fünf Jahren (WHO; 2003 Africa Malaria Report).

In Europa und in den USA wurde Malaria in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts als Folge von Kultivierung und Bewirtschaftung des Landes, großangelegte Sumpftrockenlegungen und vor allem durch den Einsatz des Insektizids DDT ausgemerzt. Ein global angelegtes Malaria-Ausrottungsprogramm der WHO wurde 1955 initiiert und scheiterte. Hohe Kosten, das Auftreten von Resistenzen bei den Überträgermücken gegen das eingesetzte Insektizid DDT und der Widerstand der Menschen gegen wiederholtes Versprühen von Insektizid beendeten die WHO Kampagne. Heute nimmt die Zahl der Malariafälle weltweit wieder zu.

Die humanpathogenen Malariaerreger werden von weiblichen Stechmücken der Gattung *Anopheles* übertragen. Phylogenetisch ist der Blutparasit ein Mitglied der Apikomplexa, Familie Plasmodiidae, die immer blutsaugende Stechmücken als Endwirte und Reptilien, Vögel und Säuger als Zwischenwirte nutzen. Wichtiges morphologisches Kennzeichen aller Apikomplexa ist der namensgebende apikale Organellenkomplex. Dieser dient der Invasion neuer Wirtszellen und besteht bei Plasmodien aus drei Organellen: dichten Granula, zwei flaschenförmigen Rhoptrien und den Mikronemen. Mikronemen, Rhoptrien und Dichte Granula enthalten Substanzen, die bei der Zellinvasion abgegeben werden.

Man unterscheidet vier verschiedene humane Malaria Parasiten, die drei verschiedene Formen der Erkrankung verursachen: *Plasmodium ovale* und *Plasmodium vivax* (Malaria tertiana), *Plasmodium malariae* (Malaria quartana) und *Plasmodium falciparum* (Malaria tropica). Von medizinischer Bedeutung sind *P.vivax* und *P.falciparum*. *P. vivax* ist für ungefähr 43% der Malaria-Erkrankungen verantwortlich. *Plasmodium falciparum* ist der gefährlichste der vier Parasitenarten und verursacht eine lebensbedrohliche Form der Malaria, Malaria tropica.

1.1.1 Der Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*

Plasmodien haben einen komplizierten Lebenszyklus, der aus mehreren Stadien besteht (Abb. 1-1).

Präerythrozytäres Stadium : Der Infektionsvorgang beginnt mit der Blutmahlzeit einer infizierten weiblichen *Anopheles*-Mücke, die dabei ungefähr 15 Sporozoiten in den Menschen injiziert (Rosenberg et al. 1990). Die einkernigen, extrazellulären Sporozoiten

wandern in Minuten über das Blutssystem in die Leber und dringen in die Leberparenchymzellen (Hepatocyten) ein. In diesen findet in fünf bis sieben Tagen die erste asexuelle Vermehrungsphase innerhalb der sogenannten „parasitophoren Vakuole“ statt. Aus einem Sporozoiten entwickelt sich erst ein Trophozoit, die „Fress-Form“, der schließlich zu einem großen vielkernigen Schizonten heranwächst. Dieser teilt sich in 20000 bis 30000 Merozoiten, die nach der Lyse des Hepatozyten in die Blutbahn gelangen.

Blutstadium: Die vom Hepatozyten stammenden Merozoiten initiieren in der zweiten Phase der Infektion den Befall der roten Blutkörperchen (Erythrozyten). Dort ernähren sich die Merozoiten vom Blutfarbstoff Hämoglobin und vermehren sich wieder über asexuelle Schizogonie. Pro befallenen Erythrozyt werden acht bis 32 Merozoiten gebildet, die nach dessen Lyse freigesetzt werden. Innerhalb von 30 Sekunden weitere rote Blutkörperchen befallen. Ein Zyklus von intra-erythrozytärem Stadium, Ruptur der Erythrozyten und Re-Invasion beginnt, der alle 48 Stunden die Parasitenanzahl 10-20-fach vermehrt, bis das Immunsystem die Infektion unter Kontrolle bringt, oder der Wirt stirbt. Das Aufplatzen der Erythrozyten überschwemmt den Wirt regelmäßig mit „Malaria-Toxinen“.

Sexuelles Stadium: Einige der frisch in den Erythrozyten eingedrungenen Merozoiten differenzieren sich nach einiger Zeit in sexuelle Formen, die weiblichen Makrogametocyten und männlichen Mikrogametozyten. Diese werden bei der Blutmahlzeit der Mücke aufgenommen und beenden dort den Lebenszyklus des Parasiten. Die weitere Entwicklung kann ausschliesslich im Verdauungstrakt der Anopheles Mücke stattfinden. Makrogametozyten entwickeln sich zu Makrogameten. Die Mikrogametozyten bilden nach entsprechenden Signalen innerhalb der Mücke, Flagellen und formen 8 haploide Mikrogameten. Befruchtung führt zur Bildung einer Zygote. Diese wandert durch die Epithelzellen des Magens und verwandelt sich dort in eine Oozyste. In der Oozyte bilden sich Sporozoiten, die schließlich in die Speicheldrüse der Mücke eindringen und von dort auf den Menschen übertragen werden können.

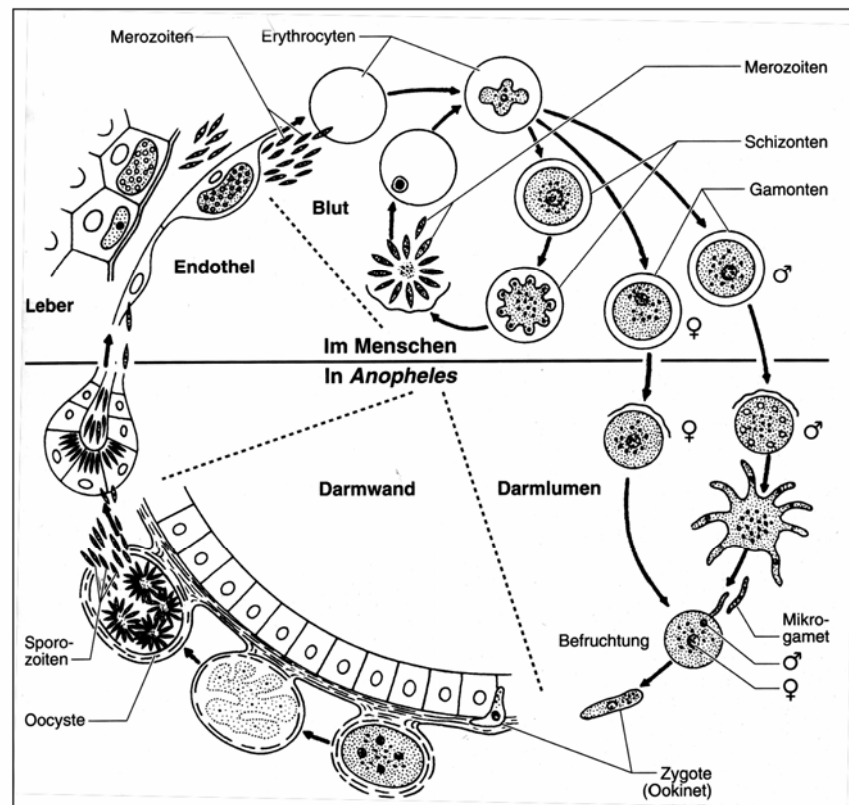


Abb. 1-1 Der Lebenszyklus von Plasmodium (aus Storch und Welsh, 1994)

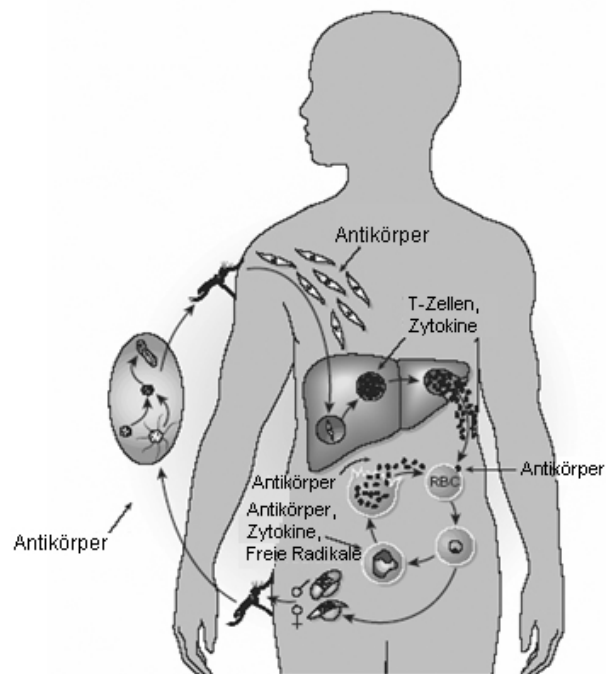


Abb. 1-2 Menschliche Immunantwort auf eine Infektion mit Plasmodium falciparum (nach Richie und Saul, 2002)

1.1.2 Pathogenese

Klinische Symptome der Malaria tropica treten erst bei der Vermehrung von Plasmodium falciparum in den Erythrozyten auf. Wenn die roten Blutkörperchen synchron aufplatzen und große Mengen der sog. „Malaria-Toxine“ in das Blut gelangen, führt das zu Fieberschüben und Schüttelfrost. Der Befall der Leber und die Entwicklung zu Gametozyten sind asymptomatisch. Von *P. falciparum* verursachte Malaria ist eine komplexe Krankheit, die mehrere Organe und Gewebe betrifft. Sie kann zu lebensbedrohlicher Anaemie und Koma in Kindern, und schweren Krankheitssymptomen bei erstgebährenden Frauen führen (Miller et al. 2002).

Nach dem heutigen Verständnis kann man in der Biologie des Parasiten drei Hauptfaktoren benennen, die zu einer gefährlichen Pathologie führen. Zum einen führt der massenhafte Befall von roten Blutkörperchen (Erythrozyten) durch Merozoiten zur Zerstörung der Erythrozyten. Dadurch kommt es zu Anämie und zu einer Beeinträchtigung der Sauerstoffversorgung. Charakteristisch für *P. falciparum* ist auch zum einen das Zusammenkleben von gesunden und befallenen Erythrozyten zu Aggregaten und zum anderen das Festheften der parasitierten Blutzellen am Endothel der Blutkapillaren, das sogenannte „Rosetting“ und „Sequestrieren“. Reife Parasiten befinden sich selten in der peripheren Blutzirkulation sondern vielmehr tief in den Geweben z.B. im Gehirn, der Lunge oder Plazenta. Die Sequestrierung verhindert den Durchfluß der parasitierten roten Blutkörperchen durch die Milz, wo sie als veränderte Erythrozyten aussortiert würden. Durch diese aktive Ansammlung der parasitierten Erythrozyten in Blutkapillaren wird die Blutzirkulation in lebenswichtigen Organen verstopft (Pasloske and Howard 1994; Miller et al. 2002).

Der dritte wichtige Punkt, der den Krankheitsverlauf beeinflusst, ist die Ausschüttung mehrerer immunologisch wirksamer Substanzen. Hohe Konzentrationen proinflammatorischer Botenstoffe, wie z.B. Tumor-Nekrosis-Faktor- α (TNF- α), scheinen mit einem schwereren Verlauf der Malariaerkrankung, in Verbindung zu stehen, vor allem mit zerebraler Malaria (Clark et al. 1987; McGuire et al. 1999). In vitro sind Malariatoxine der aufgebrochenen Schizonten Auslöser für TNF- α Ausschüttung (Taverne et al. 1990; Tachado et al. 1996). In einer neuen Studie an Kindern korrelierte die Anwesenheit von anti-Toxin- Antikörpern im Blut mit Schutz vor zerebraler Malaria (Naik et al. 2000). Mononukleare Zellen, die Hauptproduzenten von TNF- α , setzen bei massivem Auftreten von Parasiten im Blut TNF- α frei (Kwiatkowski 1989). Die gefährliche Form der Malaria wird primär durch Sequestrierung der parasitierten Erythrozyten verursacht. TNF- α fördert die Zytoadhärenz des parasitierten Erythrozyten an die Gefäßwände, indem die Expression von Wirts Liganden, wie z.B. ICAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) induziert wird (Dobbie et al. 1999). Die Rolle von TNF- α scheint allerdings ambivalent zu sein, da dem Zytokin auch eine Rolle bei der Parasitenbekämpfung zugeschrieben wird. So, kann TNF- α die Parasitenmultiplikation hemmen (Naotunne et al. 1993).

1.1.3 Mechanismen der Immunantwort

Die humane Immunantwort gegen *P. falciparum* ist nur unvollständig verstanden. Es gibt zwei Situationen, in denen man beim Menschen eine protektive Immunantwort gegen *P. falciparum* beobachten kann: Zum Einen bei der natürlich erworbenen Immunantwort von Menschen aus endemischen Gebieten („natural acquired immunity“, NAI), und zum Anderen

bei der Immunität die sich nach einer Impfung mit über γ -Bestrahlung attenuierten Sporozoiten entwickelt. In diesen beiden Systemen sind einige Segmente der humanen Immunreaktion auf *P. falciparum* gut untersucht. Während bei NAI die schützende Wirkung der Antikörper im Vordergrund steht, ist bei der Immunantwort gegen γ -bestrahlte Sporozoiten eher der zelluläre Arm des Immunsystems entscheidend.

Natürlich erworbene Immunität (NAI - natural acquired immunity) – humorale Immunantwort

Die natürlich erworbene Immunität ist eine partielle Immunität, die nach mehreren Jahren wiederholter Malariainfektionen aufgebaut wird. Sowohl die Symptome als auch die Parasitaemie sind abgeschwächt und können vom Wirt kontrolliert werden

In Bezug auf Malaria gibt es mehrere wichtige epidemiologische Beobachtungen: Der Aufbau einer aktiven Immunantwort gegen *Plasmodien* ist langsam und benötigt wiederholte Infektionen. In holoendemischen Malariagebieten werden Menschen einige hundert Male pro Jahr von *Plasmodium*-infizierten Mücken gestochen (Kitua et al. 1996). Paradoxerweise sinkt in diesen Gebieten mit hohen Übertragungsraten durch die Anopheles-Mücke das Risiko, gefährliche Malariasymptome zu entwickeln (Snow et al. 1997). Obwohl die Bewohner endemischer Gebiete oft an Malaria erkranken, ist die Immunität selten steril und meist mit einer chronischen niedrigen Parasitaemie und immer wiederkehrenden klinischen Episoden assoziiert. Mit höherem Alter wird eine partielle Immunität aufgebaut, die zuerst bei gleichbleibend hoher Parasitaemie die Krankheitssymptome lindert und schließlich die Parasitenanzahl kontrolliert. Doch die Immunkompetenz ist kurzlebig und spezifisch für die heimische *Plasmodium*-Spezies. Schon mehrere Monate ohne Parasitenbefall reichen aus, um die angeeignete Immunantwort zu verlieren und wieder anfällig für eine schwere Erkrankung zu werden.

In endemischen Gebieten werden die Kinder immuner Mütter in den ersten sechs Monaten ihres Lebens passiv über mütterliche Antikörper geschützt (McGregor 1964). In den anschließenden 1-3 Jahren, bevor die aktive Immunantwort aufgebaut wird, sind die Kinder am meisten gefährdet (Greenberg et al. 1989; Snow et al. 1994). Auch für schwangere Frauen ist Malaria mit hohen Risiken verbunden, sowohl für sich selbst als auch für den Embryo. In Gebieten mit hoher Übertragungsrate kann bei einer *P. falciparum*-Infektion häufig die Plazenta parasitiert sein. Dies führt bei neugeborenen Babies zu niedrigeren Geburtsgewichten, wodurch deren Überlebenschancen beeinflusst werden (White 1996; Granja et al. 1998).

Bei der NAI scheint die Immunantwort gegen Sporozoiten und das Leberstadium nicht entscheidend zu sein. Klinisch immune Menschen, die durch Medikamentengabe kurzfristig von Malariaparasiten befreit wurden, werden sehr schnell wieder durch einen Mückenbiß mit Sporozoiten infiziert und sind dann von Neuem parasitiert (Hoffman et al. 1987). Epidemiologische Studien unterstützen die Annahme, daß vor allem Antikörper gegen das Blutstadium zur NAI beitragen. Antikörper in Seren hyperendemischer Gebiete können in vitro die Erythrozyteninvasion der Parasiten inhibieren (Bull and Marsh 2002). Ein besonders aussagekräftiges Experiment, das die schützende Rolle von Antikörpern gegen das Blutstadium von *Plasmodium* herausstreicht, wurde von Cohen 1961 durchgeführt: Die passive Übertragung aufgereinigter Antikörper aus klinisch immunen Erwachsene auf Kinder, die schwer an Malaria erkrankt waren, verringerte deutlich deren Parasitämie (Cohen et al. 1961; Bouharoun-Tayoun et al. 1995).

Aus einer Reihe von Experimenten hat man eine Vorstellung von den spezifischen immunologischen Mechanismen gewonnen, die Immunität gegen Blut-Stadien vermitteln. Agglutinierende Antikörper gegen Oberflächenproteine von Merozoiten können invasions-inhibierend wirken, indem die Interaktionen zwischen Merozoit und Erythrozyt blockiert wird. Komplement-fixierende Antikörper gegen Oberflächenproteine können zur Lyse der Merozoiten führen (Druilhe and Perignon 1994; Good and Doolan 1999). Andere Antikörper erkennen die adhäsiven und variablen Parasitenproteine auf der Oberfläche von befallenen Erythrozyten. Die intrazellulären Parasiten können über zytophile Antikörper in der Gegenwart von Monozyten beseitigt werden (Oouvray et al. 1994; Bouharoun-Tayoun et al. 1995; Theisen et al. 1998). Zytophile IgG3 Antikörper sind in einer Studie im Senegal mit Schutz vor klinischer Malaria assoziiert worden (Aribot et al. 1996; Oouvray et al. 2000).

Effektormechanismen der zellulären adaptiven Immunantwort gegen das Blutstadium von *P. falciparum* sind noch nicht genau definiert. CD4⁺ T-Zellen haben zwei wichtige Funktionen, die bei der Kontrolle von Blutstadium-Parasiten wichtig sein können:

- sie stimulieren B-Zellen, die dadurch hoch-affine IgG Antikörper produzieren und sich zu Gedächtnis B-Zellen entwickeln
- und sie können Makrophagen und andere Zellen zur Produktion von TNF- α , reaktiven Sauerstoffmolekülen (ROS) und Stickstoffmonoxid anregen.

Bei Tiermodellsystemen für Malaria gibt es reichlich Hinweise einer direkten Beteiligung von CD4⁺ T-Zell Populationen an Immunität gegen Plasmodium-Blutstadien. Unabhängig von Antikörpern können T-Zelllinien in murinen Malariamodellen adoptiv Schutz auf Empfängermause übertragen (Amante and Good 1997; Wipasa et al. 2002). Als Mechanismus einer solchen direkt durch CD4⁺ T-Zellen vermittelten Immunität wird die Freisetzung von anti-parasitisch wirksamen Zytokinen, wie Interferon- γ (IFN- γ) diskutiert. Man sollte vorsichtig sein, diese Ergebnisse aus Tiermodellen auf die Situation einer *P. falciparum* Infektion im Menschen zu übertragen. Doch weist eine vor kurzem erschienene Studie darauf hin, daß eine niedrig dosierte Verabreichung von parasitisierten Erythrozyten Menschen sterile Immunität in der Abwesenheit von Antikörpern vermittelt (Pombo et al. 2002). Daher scheinen CD4⁺ T-Zellen auch im humanen System eine direkte Rolle in der Protektion einzunehmen.

Auch wurden bei *P. falciparum* Infektionen Malaria-antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell Populationen gefunden, die in vitro proliferieren oder Zytokine ausschütten wie z.B. IL-4 oder IFN- γ (Troye-Blomberg et al. 1994).

Zelluläre Immunantwort

Hepatozyten sind das Ziel von Sporozoiten. Die Sporozoiten wandern über das periphere Blutssystem in die Leber ein. Die spezifische Immunantwort des Wirts auf das Blutstadium des Malariaparasiten unterscheidet sich substantiell von der Antwort auf das Leberstadium. Das liegt vor allem an den verschiedenen biologischen Eigenschaften der Wirtszellen. Erythrozyten sind kernlos und können keine MHC I oder MHC II Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Deswegen sind sie im Gegensatz zu Hepatozyten nicht in der Lage, Parasitenantigene zu präsentieren und direkt CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Obwohl es reichlich Hinweise für eine aktive Immunantwort gegen das Leberstadium in endemischen Bevölkerungsgruppen gibt, können diese Effektormechanismen bei einer natürlichen Malariainfektion *Plasmodien* in der Leber nicht eliminieren. Interessanterweise erzielte Nussenzweig in Immunisierungsexperimenten mit γ -bestrahlten attenuierten Sporozoiten einen vollständigen Schutz in der Maus, der spezifisch gegen das Leberstadium

gerichtet war. (Nussenzweig et al. 1967). Dieser Immunisierungs-Ansatz konnte sechs Jahre später auch Menschen vor einer *P. falciparum*-Infektion mit unbehandelten Sporozoiten schützen (Clyde et al. 1973). Es konnten keine Parasiten im Blut nachgewiesen werden. Die Vakzinierung mit γ -bestrahlten Sporozoiten dient seitdem als Modellsystem, um die protektive Immunantwort gegen Sporozoiten und intrazelluläre Leberstadien von Plasmodium zu studieren. Die resultierenden Erkenntnisse sind im Hinblick auf eine Impfstoffentwicklung gegen das Sporozoiten- und Leberstadium von großem Interesse.

In Experimenten an murinen Malariasystemen wurde die Immunantwort gegen γ -bestrahlte Sporozoiten am detailliertesten analysiert. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte jedoch beachtet werden, daß diese je nach verwendetem Mäuse- und Parasitenstamm variieren können (Doolan and Hoffman 2000).

Attenuierte Sporozoiten können zwar in die Leberzellen eindringen und dort Proteine exprimieren, doch die weitere Entwicklung zum reifen Merozoiten ist unterbrochen. γ -bestrahlte Sporozoiten können mehrere Monate in der Leber verharren. Man konzentrierte sich zunächst auf die Charakterisierung von Antikörpern, die gegen Oberflächen-Antigene von injizierten γ -bestrahlten Sporozoiten gerichtet waren. Die Übertragung von Serum-Antikörpern aus Mäusen, die mit γ -Sporozoiten immunisiert waren, führte nicht zum Schutz von naiven Mäusen. Die Serum-Antikörper konnten also nicht für den Schutz verantwortlich sein. Hingegen gewährte die adoptive Übertragung immuner Milzzellen auf naive Mäuse Schutz (Doolan and Hoffman 2000). Diese Studien suggerieren, daß der zelluläre Arm des Immunsystems einen wichtigen Teil der Immunität vermittelt. Auch konnte man in Experimenten mit knockout-Mäusen ohne funktionelle MHC I Rezeptoren zeigen, daß die protektive Wirkung der Immunisierung mit γ -Sporozoiten erlischt ($\beta 2m^{-/-}$) (White et al. 1996).

Von infizierten Leberzellen präsentierte Parasitenantigene werden als Dreh- und Angelpunkt betrachtet, um eine schützende Immunreaktion zu entwickeln. Als die wichtigsten Akteure gegen parasitierte Hepatozyten betrachtet man die CD8⁺ positiven zytotoxischen T-Zellen (Cytotoxic T-Lymphocytes(CTL)). So kann der passive Transfer von CD8⁺ T-Zell-Klonen, die spezifisch für das CSP oder für das Sporozoite Surface protein 2 (SSP2) sind, naiven Mäusen Schutz vermitteln (Romero et al. 1989; Khusmith et al. 1991). Wenn *in vivo* CD8⁺ T-Zellen durch anti-CD8⁺ Antikörper entzogen werden, wird in den meisten Maus Systemen keine protektive Immunität mehr etabliert (Weiss et al. 1988). Außerdem können Milzzellen von γ -Sporozoiten-immunisierten Mäusen *in vitro* infizierte Hepatozyten töten. Diese Eliminierung ist MHC-Klasse-I abhängig, so daß infizierte Hepatozyten hauptsächlich von CD8⁺ CTL-Zellen eliminiert werden (Hoffman et al. 1989).

Für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen müssen Antigene im Kontext von MHC I Klasse Rezeptoren (=HLA Klasse-I) auf der Oberfläche der Zellen zusammen mit kostimulatorischen Molekülen präsentiert werden. Die Bindung von Antigenen an MHC I Rezeptoren setzt deren proteasomale Degradierung voraus. Die Spezifität der CD8⁺ T-Zell Erkennung wird durch den Typ des HLA Klasse-I Rezeptors beeinflusst („HLA-Restriktion“), da diese unterschiedliche Antigene binden. Aktivierte CD8⁺ CTLs haben mehrere Möglichkeiten, parasitierte Zellen zytolytisch zu eliminieren. Eine Aktivierung führt über den FasL/Fas Liganden und eine Signalkaskade zur Apoptose der infizierten Zelle. Eine andere Möglichkeit ist die Freisetzung eines chemischen Cocktails aus Perforin und Granzymen aus den aktivierten T-Zellen, die so die infizierte Zelle töten (Lowin et al. 1994; Denkers et al. 1997; Lalvani et al. 1997). Im Falle einer Plasmodium Infektion wird jedoch die Ausschüttung des Botenstoffes IFN- γ als wichtigste Aktivität der CD8⁺ T-Zellen betrachtet

(Doolan and Hoffman 2000): in Fas- oder Perforin knock-out Mäusen, die mit γ -Sporoziten immunisiert wurden, kann eine effektive Immunantwort aufgebaut werden (Renggli et al. 1997).

IFN- γ ist ein Zytokin, das nach Aktivierung der CTLs gebildet wird und am Zielort über die Induktion des Nitrit-Oxid-Synthase Gens (iNOS) zur Entstehung von intrazellulärem Stickstoff-Monoxid (NO) führt, das den intrahepatischen Schizonten tötet. Mit γ -bestrahlten Sporoziten immunisierte Mäuse, die mit anti-IFN- γ oder mit einem Inhibitor der Nitrit-Oxid-Synthase behandelt wurden, sind nicht mehr immun gegen eine Sporoziteninfektion (Schofield et al. 1987; Weiss et al. 1988; Seguin et al. 1994). Bemerkenswerterweise können Affen durch systemische Gabe von IFN- γ oder Interleukin-12 vor Malaria geschützt werden (Maheshwari et al. 1986; Hoffman et al. 1997). Einen weiteren Hinweis für die zentrale Rolle von IFN- γ erbrachte eine Studie in Gabon, in der bei Kindern mit milder Malaria eine Mutation im induzierbaren Nitrit-Oxid-Synthase Gen signifikant häufiger auftrat als in Kindern mit schwerer Malaria (Kun et al. 1998).

Die augenblickliche Hypothese deutet die IFN- γ Ausschüttung als Konsequenz der CD8+ T-Zell Aktivierung. IFN- γ initiiert daraufhin die Bildung von Interleukin (IL-12), das von Makrophagen und Kupfferzellen gebildet wird. Über eine positive Rückkopplung verstärkt IL-12 wiederum die Produktion von IFN- γ (Doolan and Hoffman 2000).

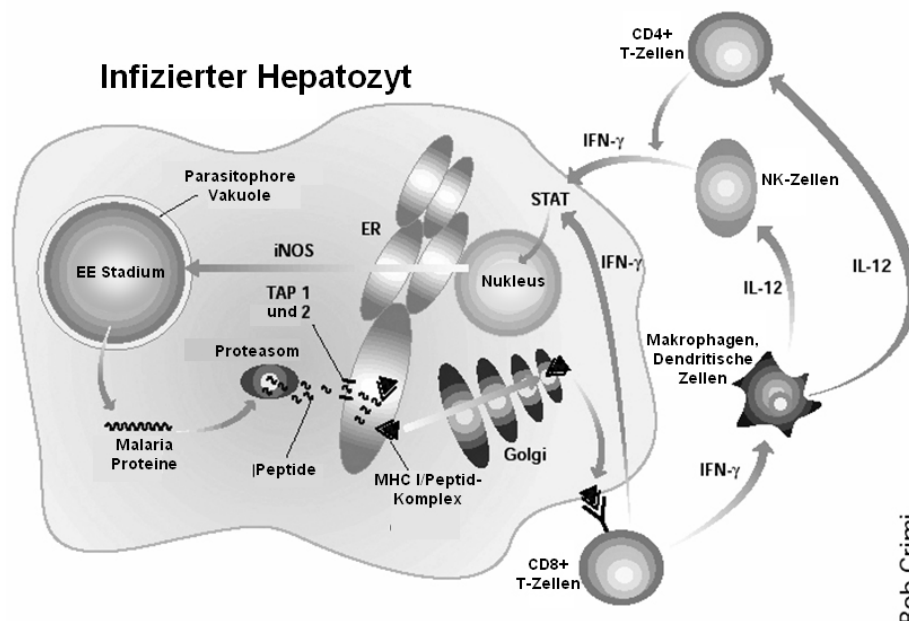


Abb. 1-3 Mechanismen einer Immunantwort gegen Plasmodium infizierte Hepatozyten (nach Hoffman und Doolan, 2000)

Die protektive Immunantwort gegen infizierte Hepatozyten wird hauptsächlich von antigen-spezifischen CD8+ T-Zellen vermittelt. Diese erkennen Parasiten-spezifische Peptide, die auf der Hepatozyten-Zelloberfläche mit MHC Klasse-I Rezeptoren assoziiert sind. Die kurzen Peptide stammen von cytoplasmatischen Malaria-Proteinen, die im Cytoplasma durch das Proteasom gespalten werden. Die so prozessierten Peptide werden über Transporter, TAP1 und TAP2, in das Endoplasmatische reticulum (ER) transportiert. Dort assoziieren sie mit MHC Klasse-I Molekülen. Der Peptid-MHC-Komplex wandert über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche. Dort erkennen CD8+ T-Zell-Rezeptoren die präsentierten Komplexe. Aktivierte CD8+ T-Zellen produzieren IFN- γ . Die IFN- γ Produktion kann durch andere Cytokine verstärkt werden, z.B.: IL-12, das von anderen immunologischen Zellen gebildet wird. IFN- γ induziert die Transkription der Nitrit-Oxid-Synthase (iNOS) und damit die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), das den intrazellulären Parasiten tötet.

Humane CD8+ T-Zell-Antwort gegen P. falciparum

Mit γ -Sporozoiten immunisierte Freiwillige haben nachweislich spezifische CD8+ T-Zellen, die Epitope verschiedener *P. falciparum* Proteine im infizierten Hepatozyten erkennen, z.B. Epitope von CSP, SSP2, Exported protein 1 und Liver-Stage-Antigen-1 (LSA-1) (Hoffman 1996). Ähnlich wie im Maus-Malaria-Modell und bei immunisierten Freiwilligen findet man auch unter den Bedingungen einer natürlichen Plasmodium-Infektion eine Immunantwort gegen Sporozoiten. Dieselben Parasitenproteine können auch bei malaria-exponierten Populationen während einer Malaria Infektion CD8+ T-Zellen aktivieren (Doolan et al. 1996). Jedoch ist die Häufigkeit von Malaria-spezifischen CD8+ T-Zellen in natürlichen Populationen allgemein niedrig, verglichen mit der Frequenz von CD8+ T-Zellen bei viralen Infektionen, wie z.B. HIV, und mit der Frequenz in Freiwilligen, die mit γ -Sporozoiten immunisiert wurden (Lalvani et al. 1996; Plebanski et al. 1997). Inwieweit diese CD8+ T-Zell Aktivität, die spezifisch gegen Malaria-Antigen gerichtet ist, zum Schutz gegen eine *P. falciparum* Infektion beiträgt, konnte in diesen Studien nicht geklärt werden.

Es gibt eine Reihe von Befunden die darauf hin deuten, daß die CD8+ T-Zell Antwort in natürlichen Malariainfektionen tatsächlich Schutz vermittelt. Ergebnisse einer Reihe von Studien an Bevölkerungen endemischer Gebiete zeigen, daß es eine natürlich erworbene Immunantwort gegen das LSA-1 gibt (Connelly et al. 1997; Luty et al. 1999; John et al. 2000). Indirekte Beweise für die klinische Relevanz von zytotoxischen T-Zellen gegen LSA-1 im Menschen lieferte erstmals eine große Studie in Gambia. Kinder mit milderen Malariasymptomen hatten signifikant häufiger das HLA Allel B53. Später konnte gezeigt werden, daß mildere Symptome mit CD8+ T-Zell abhängiger zytolytischer Aktivität gegen ein HLA B53 spezifisches Epitop von LSA-1 korrelierten (Hill et al. 1991; Hill et al. 1992). Die meisten LSA-1 bezogenen Studien, in Malaria-exponierten Populationen ergaben eine Korrelation zwischen der IFN- γ Produktion gegen LSA-1 und Schutz vor Malaria. In einer Studie in Papua Neu Guinea korrelierte die IFN- γ Bildung gegen ein LSA-1 Epitop mit der Abwesenheit von Parasitämie für sechs Monate in Erwachsenen (Connelly et al. 1997). Es wurden weitere Epitope von Antigenen identifiziert, die spezifische erworbene Immunantworten gegen das Leberstadium induzieren (Sedegah et al. 1992; Aidoo et al. 1995; Lalvani et al. 1996; Doolan et al. 1997; Aidoo et al. 2000). Insgesamt verdeutlichen die Befunde, daß bei der natürlichen CD8+ T-Zell Antwort gegen intrazelluläre Parasiten im Leberstadium wahrscheinlich eine Vielzahl von Antigenen involviert sind, die insgesamt eine schützende Wirkung propagieren.

1.2 Suche nach einem Impfstoff gegen *P.falciparum*

1.2.1 Immunologische Aspekte von Malaria-Impfstoffen

100 Jahre nachdem Dr. Lavern 1861 den Malaria Parasiten identifiziert hat, steigt die Zahl der dokumentierten Malaria Fälle wieder an. Die Kontrolle der Krankheit wird durch die Verbreitung von Resistenzen der Anopheles-Stämme und Plasmodium-Parasiten gegen gebräuchliche Insektizide und Malariamedikamente immer schwieriger. Die Sequenzierung der Genome von *Anopheles gambiae* und *P. falciparum* hilft zwar, potentielle Angriffspunkte für neue anti-Malaria Medikamente zu finden und deren Entwicklung zu beschleunigen (z.B. Fosmidomycin)(Jomaa et al. 1999). Doch auch gegen neue Medikamente können sich im Laufe der Zeit vor allem bei mißbräuchlicher Nutzung Resistenzen entwickeln. Daher ist die

wahrscheinlich langfristig attraktivste und effizienteste Alternative der Malaria Kontrolle ein Impfstoff gegen den Parasiten.

Mit einer Impfung versucht man, eine langfristige Immunantwort gegen Antigene eines Erregers aufzubauen, so daß bei einer späteren Infektion eine schnelle und effektive Eliminierung des Erregers erfolgt. Ein wichtiger Ausgangspunkt für die Suche nach potentiellen Antigenen für einen Malaria Impfstoff sind diejenigen Antigene, die in der NAI und beim γ -bestrahlten Sporozoiten-Modell mit Schutz korrelieren. Diese werden für gute Kandidaten eines Impfstoffs gehalten, der wahrscheinlich eine Kombination mehrerer Antigene sein wird. Man geht davon aus, daß dieser sog. multivalente Ansatz, am erfolgsversprechendsten ist. Die augenblickliche Herausforderung besteht daher in der Identifizierung einzelner protektiver Antigene und deren Kombination zu einem Impfstoff. Es sind Beispiele potentiell schützender Antigene aus Leber-, Blut- und Gametenstadium des Parasiten bekannt (s. unten). Je nach Angriffsziel verfolgen die Impfstoffe zudem unterschiedliche immunologische Ziele (Abb. 1-2).

Man unterscheidet verschiedene Kategorien von Malaria-Impfstoffen. Impfstoffe werden entwickelt gegen extrazelluläre Sporozoiten, das intrazelluläre Leberstadium, den extrazellulären Merozoiten im Blut, das asexuelle Blutstadium in den Erythrozyten, die sexuellen Formen des Parasiten und gegen toxische Stoffe aus zerstörten Erythrozyten. Kandidatenantigene der unterschiedlichen Entwicklungsformen des Parasiten sind fast ausnahmslos Oberflächenproteine.

Eine präerythrozytäre Vakzine könnte über eine humorale Immunantwort Sporozoiten am Eindringen in Hepatozyten hindern. Eine zweite Möglichkeit wäre die Eliminierung der intrazellulären Parasiten in Leberparenchymzellen durch Malaria-antigen-spezifischen zytotoxische T Zellen, z.B. über die Produktion von IFN- γ und dem Effektormolekül NO (Miller and Hoffman 1998).

Der Erfolg von Morbiditäts-reduzierenden Impfstoffen, von Impfstoffen gegen das Mücken-Stadium und gegen das asexuelle Blutstadium hängt vor allem von einer starken Antikörperantwort ab. Diese Antikörper können einerseits die Invasion eines neuen Erythrozyten vereiteln, indem sie die Interaktion von Oberflächenmolekülen des Merozoiten mit den Erythrozyten blockieren. Andererseits können agglutinierende Antikörpertypen durch gekoppelte Komplementaktivierung mit Hilfe von Freßzellen zur Lyse der extrazellulären Parasiten führen. Gegen das extrazelluläre Gameten-Stadium wären ebenfalls Antikörper effektiv. Auch innerhalb der Erythrozyten bleibt *P.falciparum* immunologischem Druck ausgesetzt. Die „Höcker“, die parasitierte Erythrozyten auf ihrer Membran-Oberfläche ausbilden, haben Parasiten-Proteine eingelagert wie z.B. PfEMP1 (s. unten). Diese Proteine sind ein weiterer Angriffspunkt für zytophile Antikörper, die in Gegenwart von Monozyten zur Zerstörung der parasitierten Erythrozyten führen können (Bouharoun-Tayoun et al. 1995). Alle Impfstoffe, die im Moment verwendet werden, egal ob lebendig attenuiert, getötet oder rekombinantes Protein, induzieren vor allem eine humorale Immunantwort. Spezifisch bei der Entwicklung eines Impfstoffes gegen *P. falciparum* wurde man dagegen immer wieder mit der Schwierigkeit konfrontiert, daß eine Immunantwort gegen die bis jetzt entwickelten rekombinanten Impfstoffe zu schwach ausfiel. Ein potentielles Defizit der nicht-lebend Impfstoffe besteht in der ineffizienten Stimulierung des zellulären Arms des Immunsystems. Das ist von Nachteil für ihren Einsatz bei Krankheiten wie Malaria oder auch bei einer HIV Infektion, die für eine wirksame Bekämpfung auch eine starke zelluläre Immunantwort brauchen.

Obwohl etliche Malaria-Protein-Impfstoffe vielversprechend sind und man viel Erfahrung mit ihnen gesammelt hat, sind DNA-Immunisierungen gegen *Plasmodium* interessante Alternativen. Sie können sehr komplex sein und humorale und vor allem auch zelluläre Immunantworten stimulieren. Die Hoffnung, daß DNA Impfstoffe die Lösung des Problems sind, wird gedämpft durch die relativ schwache Immunreaktion auf diese Art Impfstoff beim Menschen (Wang et al. 1998). Am bekanntesten ist die Multistage Malaria DNA Vaccine Operation Vakzinentwicklung (MuSTDO), die gegen das Sporozoiten-, Leber- und Blutstadium eine Immunantwort induzieren soll (Le et al. 2000; Doolan and Hoffman 2001). Dieser Impfstoff ist auch ein Beispiel für den Trend in der Malaria Impfstoffentwicklung, multi-Komponenten multi-Stadien Impfstoffe zu entwickeln. Diese enthalten mehrere Antigene/Antigen-Epitope aus verschiedenen Entwicklungsstufen des Parasiten. Der Erreger soll so auf mehreren Ebenen gleichzeitig bekämpft werden.

Eine andere Methode, um rekombinante Proteine immunogener zu machen, ist die Fusion mit immunodominanten T-Zell-Epitopen oder eine Einbettung in immunogene Trägermoleküle.

Die meisten Immunogene müssen in immunogenen Lösungen verabreicht werden, um gute Impfergebnisse zu produzieren, sogenannten „Adjuvantien“. Das ist problematisch, da das einzige breit verwendete Adjuvants im Menschen, bisher in Kombination mit Malaria Impfstoffen eine nur unzureichend immunogene Wirkung hatte. Dieses Aluminium-Hydroxid oder „Alum“ verstärkt zwar die Antikörperproduktion, zeigt jedoch wenig Wirkung auf die T-Zell Antwort. Es gibt jedoch einige neuere Adjuvantien, monophosphoryl Lipid A („QS21“), und eine Öl-in-Wasser Emulsion („SBAS2“), die eine starke Antkörperantwort induzieren und die zelluläre Immunreaktion stärker stimulieren.

1.2.2 Impfstofftypen

Die Stadien vor den asexuellen Blutstadien werden als prä-erythrozytär bezeichnet und beziehen sich auf Sporozoiten- und Leberzellstadium von *Plasmodium*. Ein effektiver Impfstoff gegen diese Stadien hat zum Ziel, den Befall der roten Blutkörperchen und die klinischen Manifestationen zu verhindern. Zusätzlich würde solch ein Impfstoff auch die Übertragung der Parasiten blockieren, da die sexuellen Stadien erst im Blutstadium entstehen. Das wäre ideal für Menschengruppen, die vorher keinen Kontakt mit dem Malariaerreger hatten, also z.B. Touristen, Soldaten oder Flüchtlinge, die sich in *P. falciparum*-endemische Gebiete begeben.

Die Impfung mit bestrahlten Sporozoiten kann bisher aus praktischen Gründen nicht in großem Maßstab durchgeführt werden. Die ersten Versuche, einen präerythrozytären Impfstoff zu entwickeln, konzentrierten sich auf ein Oberflächenprotein des Sporozoiten: das „Circumsporozoite Protein (CSP)“ und führten u.a. zur sogenannten „RTS,S“ Vakzine.

Der RTS,S Impfstoff besteht aus zwei Polypeptiden, die in *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert werden. „RTS“ ist eines der Polypeptide und enthält immunodominante repetitive Sequenzen von CSP (sogenannte „NANP“ Sequenzen) und den C-terminalen Bereich von CSP des 3D7 Stammes von *P. falciparum*. (Kumar et al. 1988; Sinigaglia et al. 1988; Good et al. 1998). „S“ steht für das „Hepatitis surface antigen“ (HBsAg) (Gordon et al. 1995). Im RTS,S Impfstoff wird CSP in das hoch immunogene HBsAg eingelagert, um eine starke Immunantwort zu garantieren. Der finale Impfstoffkandidat wurde dann mit einem experimentell bestimmten Adjuvants („SBAS2“), in einem Feldveruch semi-immunen Männern in Gambia verabreicht (Bojang et al. 2001). Insgesamt war das Ergebnis

enttäuschend: Das Auftreten von Parasiten im Blut war zwar in den ersten neun Wochen bei 65% der Erwachsenen verzögert. Doch Ende der 15-wöchigen Nachfolge-Untersuchung waren Kontrollgruppe und Geimpfte gleichermaßen parasitiert (Bojang et al. 2001).

Die Gründe für die mangelnde Effizienz des RTS,S Impfstoffes sind wichtig für die weitere Impfstoffentwicklungen: Im Laufe der follow-up Phase nach Impfung sanken Antikörpertiter gegen CSP immer weiter ab und entsprachen am Ende den Durchschnittstitern nach der ersten Immunisierung. Das zeigt, daß die anfänglich hohen Titer, trotz der natürlichen Verstärkung durch erneute Infektionen in der Regensaison nicht aufrechterhalten wurden (Stoute et al. 1998). Ein weiteres Problem könnte die mangelnde Spezifität der ausgelösten Immunantwort sein. Zwar werden durch die Vakzinierung CD4+ T-Zell Aktivität und Antikörper induziert, doch sind keine CSP-spezifischen CD8+ T-Zell Antworten detektierbar (Lalvani et al. 1999).

Es gibt außer CSP noch weitere Antigene, die von infizierten Leberparenchymzellen präsentiert werden können. Unter diesen befinden sich vielversprechende Impfstoffkandidaten wie z.B. LSA-1 und LSA-3, und auch Proteine, die sich später im Merozoiten wiederfinden, wie MSP-1 (Szarfman et al. 1988; Daubersies et al. 2000; Kurtis et al. 2001). LSA-1 und LSA-3 werden auf ihr Potential als Impfstoff näher untersucht. Immunisierungen von Mäusen mit den entsprechenden orthologen Proteinen schützt vor einer Sporozoiten-induzierten Malaria (Hoffman 1996). LSA-1 löst eine Immunreaktion bei Menschen aus endemischen Malaria-Regionen aus, die mit Schutz assoziiert wird (Kurtis et al. 2001). Rekombinantes LSA-3 Protein oder synthetische Peptide des LSA-3 Proteins schützten Chimpanse vor einer Infektion mit Sporozoiten (Daubersies et al. 2000).

Die sogenannten Übertragungs-blockierenden Impfstoffe werden entwickelt, um Gameten-Stadien zu neutralisieren. Dafür müssen im Menschen Antikörper generiert werden, die bei der Blutmahlzeit der Mücke mit aufgenommen werden. Im Magen der Mücke sollen diese menschlichen Antikörper die weitere Entwicklung des Parasiten blockieren.

Eine weitere interessante Idee sind sogenannte Pathogenese-reduzierenden Impfstoffe. Es werden Strategien entwickelt, die das Sequestrieren von Plasmodium verhindern oder Malariatoxine, wie z.B. den Glykosylphosphatidylancker (GPI), der als Verankerungseinheit in etlichen Parasiten Proteine vorhanden ist, neutralisieren. Würde dieser Anker durch humane Antikörper neutralisiert werden, könnte man gefährliche Krankheitssymptome der Malaria tropica abschwächen.

Impfstoffe gegen das erythrozytäre oder asexuelle Blutstadium wenden sich gegen freie Merozoiten und parasitierte Erythrozyten. Es wäre ideal, wenn sich *P. falciparum* während der prä-erythrozytären Phase stoppen liesse, die noch asymptomatisch ist. Doch dieses Ziel ist mit einer Impfung schwer zu erreichen, da ein einziger infizierter Hepatozyt, welcher der Immunisierungsüberwachung entgeht, für den Befall der roten Blutkörperchen ausreicht. Die Mehrzahl der exprimierten Malaria-Antigene unterscheidet sich bei den verschiedenen Stadien. Daher würde bei einer prä-erythrozytären Vakzine keine Immunität gegen Merozoiten und parasitierte Erythrozyten existieren. Eine nicht hundertprozentig wirksame prä-erythrozytäre Vakzine könnte daher zu schweren Malaria-Erkrankungen führen. Im Gegensatz dazu hat ein Impfstoff gegen das Blutstadium von *Plasmodium* vor allem die Aufgabe, die Mortalität und Morbidität der Erkrankung zu verringern und muss nicht unbedingt eine sterile Immunität gegen den Erreger erzielen. Die Zielgruppen einer solchen Vakzine befinden sich in Malaria-endemischen Gebieten, in denen besonders die gefährdeten Kleinkinder von profitieren würden.

Interessante Antigene für einen Impfstoff gegen asexuelle Blutstadien sind Proteine, die auf der Merozoitenoberfläche exprimiert werden und sich an der Invasion in die Erythrozyten beteiligen oder aber Parasitenproteine in der Oberflächenmembran des parasitierten Erythrozyten, die für die Sequestrierung von *P. falciparum* verantwortlich sind.

Das Apical-Membrane-Antigen1 (AMA-1) ist ein in den Rhoptrien lokalisiertes Protein, das nach Aufbrechen der Schizonten auch auf der Merozoitenoberfläche gefunden wird (Triglia et al. 2000). In einer Studie konnten Antikörper von humanem Serum, die gegen eine Ectodomäne von AMA-1 gerichtet waren, die Invasion von sowohl homologen als auch heterologen *P. falciparum*-Merozoiten stark hemmen (Hodder et al. 2001). Auch konnten Saimiri Affen, die mit Bakulovirus-produziertem AMA-1 von *P. fragile* geimpft wurden, sowohl eine Infektion mit *P. fragile* als auch mit heterologem *P. falciparum* bis zur undetektierbaren Parasitaemie beherrschen (Collins et al. 1994). Diese Ergebnisse weisen auf schützende konservierte Epitope hin, die aus AMA-1 einen vielversprechenden Impfstoffkandidaten machen.

Einen Impfstoff mit dem *P. falciparum* Erythrocyte Membrane Protein 1 (PfEMP-1) zu entwickeln ist wegen der hohen Variabilität des Proteins problematisch (Baruch et al. 1995; Smith et al. 1995). PfEMP-1 befindet sich auf der Erythrozytenoberfläche und ist u. a. für die Adhäsion von infizierten Erythrozyten an CD36 Rezeptoren von Endothelzellen oder an Chondroitinsulfat A („CSA“) der Plazenta verantwortlich. PfEMP-1 enthält ebenfalls konservierte extrazelluläre Bereiche. Antikörper gegen diese Bereiche wirken auch gegen heterologe Plasmodiumstämme, so daß man von konservierten immunogenen Epitopen ausgehen kann. Es müßte also möglich sein, einen anti-Adhäsions-Impfstoff zu entwickeln, der Antikörperantworten gegen CSA-bindende Parasiten auslöst und damit Schwangere schützt.

Das EBA-75 von *P. falciparum* Merozoiten ist ebenfalls Ziel intensiver Impfstoffentwicklungen. Die funktionelle Eigenschaft des EBA-75 Moleküls, als Ligand auf der Erythrozytenoberfläche Glycophorin A zu binden impliziert die Möglichkeit, über einen Impfstoff die Invasion der Parasiten in rote Blutkörperchen zu hemmen. Die rekombinant hergestellte Bindungsdomäne von EBA-75 („RII“) hat in Immunisierungen zu protektiven Immunantworten bei Aotus Affen geführt (Jones et al. 2001).

Außer EBA-75 gibt es noch verschiedene Oberflächenproteine des Merozoiten, die alle potentiell Ziel einer protektiven Immunantwort sind. Epidemiologische Untersuchungen finden sowohl für das MSP-2 (merozoite-surface-antigen2) als auch für MSP-3 Hinweise auf immunologisch relevante Epitope, die mit Schutz korrelieren (Oeuvray et al. 1994; Taylor et al. 1998). Der vielversprechendste Kandidat der Merozoiten Oberflächenproteine ist jedoch das Merozoite-Surface-Protein-1 (MSP-1).

1.3 Das Merozoitenoberflächenprotein-1: MSP-1

Bei der andauernden Suche nach einem Impfstoff gegen das erythrozytäre Stadium ist MSP-1 das am besten charakterisierte Zielantigen auf der Merozoitenoberfläche. Es ist ein 190-bis 200-kDa großes Protein, das während des Lebenszyklus des Parasiten zum ersten Mal in späten Trophozoiten und Schizonten des Leberstadiums nachgewiesen werden kann (Szarfman et al. 1988; Suhrbier et al. 1989). Wenn ausgewachsenen Leber-Schizonten die invasiven Blutstadien in das Blutssystem entlassen, ist MSP-1 homogen auf deren Oberfläche verteilt und bildet das Hauptoberflächenprotein der Merozoitenhüllen.

1.3.1 MSP-1: Komplex und Prozessierung

Das Membranprotein ist über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker mit der Merozoitenoberfläche verbunden. Während der Schizogonie wird ein großes Vorläuferprotein (190-kDa) synthetisiert, welches nach dem Translozieren an die Merozoitenoberfläche in vier Hauptfragmenten prozessiert wird. Diese Fragmente p83 (N-Terminus), p30 und p38 (zentral gelegen) und p42 (C-Terminus) bilden einen nicht-kovalent assoziierten Komplex auf der Merozoitenoberfläche des Parasiten (McBride and Heidrich 1987). p42 verbindet den Komplex über die GPI-Einheit mit der Parasitenmembran. Zusätzlich sind an den Komplex noch mindestens zwei Polypeptide assoziiert, die nicht aus dem 190-kDa Protein stammen, nämlich MSP-7, 22-kDa und MSP-6, 36-kDa (Stafford et al. 1996).

Das primär prozessierte MSP-1 wird bei der Invasion eines roten Blutkörperchens ein zweites Mal gespalten, wobei aus dem 42-kDa Fragment p33 und p19 entsteht. Für beide proteolytischen Spaltungsprozesse sind die verantwortlichen Proteasen nicht identifiziert (Cooper and Bujard 1992). Während das C-terminale 19-kDa Fragment membrangebunden bleibt und die Invasion in den Erythrozyten „überlebt“, wird das 33-kDa Fragment mit dem Rest des Komplexes abgestreift (Blackman et al. 1990). Diese Prozessierungsprodukte sind auch im Überstand von *P. falciparum* Kulturen zu finden (Holder et al. 1985).

1.3.2 Struktur

Die Sequenzanalyse von MSP-1 Genen verschiedener *P. falciparum* Isolate ergab, daß sich die p190-Allele zwei verschiedenen Grundtypen, dem MAD20 oder K1 Typ, zuordnen lassen und daher als „dimorph“ bezeichnet werden. Zwischen den langen dimorphen Bereichen des Moleküls gibt es auch hoch konservierte Regionen, insbesondere an den Enden von MSP-1 und kurze Abschnitte höherer Homologie sowie zwei variable Abschnitte, weshalb das MSP-1 Gen in 17 Sequenzblöcke eingeteilt wurde (Tanabe et al. 1987; Miller et al. 1993) (Abb. 1-4, A). Im konservierten Block eins befindet sich N-terminal eine 19 AS lange Signalpeptidsequenz, die im Endoplasmatischen Retikulum abgespalten wird. Block zwei und vier sind als einzige Abschnitte oligomorph und existieren in mehr als zwei verschiedenen Sequenztypen (Peterson et al. 1988). Der für p19 kodierende C-Terminus, Block 17, ist hoch konserviert. Man findet in Block 17 nur vier Aminosäuresubstitutionen in verschiedenen Laborisolaten von *P. falciparum*, und auch in Feldisolaten ist die Variabilität stark begrenzt. Dieser cysteinreiche Bereich des Proteins faltet sich über sechs Disulfidbrücken zu Domänen, die dem epidermalen Wachstumsfaktor ähnlich (EGF-Domänen) sind, und deren Struktur durch NMR Spektroskopie aufgeklärt ist (Morgan et al. 1999). Als weitere Besonderheit enthält die Region am äußersten C-Terminus eine Membranankersequenz (Mackay et al. 1985). Die hydrophoben Aminosäuren werden abgespalten und durch den vorsynthetisierten GPI-Anker ersetzt. Die Vorstellung, daß MSP-1 glykosyliert wird (Dieckmann-Schuppert et al. 1994) ist inzwischen überholt (Berhe et al. 2000).

Außer für den C-terminalen Teil war über die Struktur der restlichen ungefähr 95% des MSP-1 Komplexes bis vor kurzem wenig bekannt. In einer aktuellen Arbeit wurden Interaktionsstudien zwischen rekombinant hergestellten MSP-1 Proteinen und partiell proteolytische Verdaus der erhaltenen Komplexe durchgeführt. Dadurch konnte ein strukturelles Modell vorgeschlagen werden, das das Arrangement der MSP-1 Untereinheiten

untereinander und die Verteilung von kompakten und flexibleren Domänen innerhalb des Komplexes beschreibt (Kauth et al. 2003)(Abb. 1-4, C).

1.3.3 Funktion von MSP-1

Die genaue Funktion von MSP-1 ist unklar. Mehrere Hinweise deuten auf eine Beteiligung des Proteinkomplexes beim Eindringen in den Erythrozyten. Die Invasion des Merozoiten in einen Erythrozyten ist ein mehrstufiger Prozess, beginnend mit dem Anheften des Merozoiten an die Erythrozytenoberfläche. Anschließend orientiert sich der Parasit um, so daß das apikale Ende mit den Organellen Rhoptrien, Micronemen und Dichte Granula den Kontaktpunkt bildet. Der Merozoit ist nun irreversibel gebunden. Es beginnt der aktive Invasionsvorgang, bei dem sich durch Einstülpen der Wirtsmembran die parasitophore Vakuole bildet. Perkins zeigte 1988, daß MSP-1 Sialinsäure auf den roten Blutkörperchen binden kann, so daß MSP-1 zumindest an der initialen Anheftung an den Erythrozyten beteiligt sein könnte (Perkins and Rocco 1988).

Die Hemmung des zweiten Prozessierungsschrittes von MSP-1 Untereinheit p42 durch Antikörper blockiert die Invasion, so daß der Komplex in diesen Vorgang involviert ist und notwendig zu sein scheint (Blackman et al. 1994). Auch aufgrund dieser Daten richtet sich das Interesse vor allem auf den C-terminalen Teil von MSP-1 mit den zwei EGF-ähnlichen Domänen, die in homologen Molekülen Bindungsfunktionen haben. Deletiert man *msh-1* in *P. falciparum* über homologe Rekombination, sind die Parasiten nicht lebensfähig (O'Donnell et al. 2000). Dies bedeutet, daß MSP-1 für die Lebensfähigkeit von *P. falciparum* essentiell ist. In der gleichen Arbeit von O'Donnell wird die funktionelle Konservierung des 19-kDa Fragmentes bei verschiedenen Plasmodiumarten demonstriert. Die EGF-Domäne des *P. falciparum* 19-kDa Fragmentes konnte erfolgreich mit der entsprechenden Domäne eines Nager-Malaria Erregers, *P. chabaudi*, komplementiert werden. Dies ist insofern erstaunlich, da *P. chabaudi* p19 nur 34% Sequenzhomologie zu *P. falciparum* aufweist. Daher scheint die Funktion, die p19 bei der Erythrozyten Invasion spielt, bei den verschiedenen Plasmodium Arten ähnlich zu sein, trotz großer Unterschiede in der AS Sequenz.

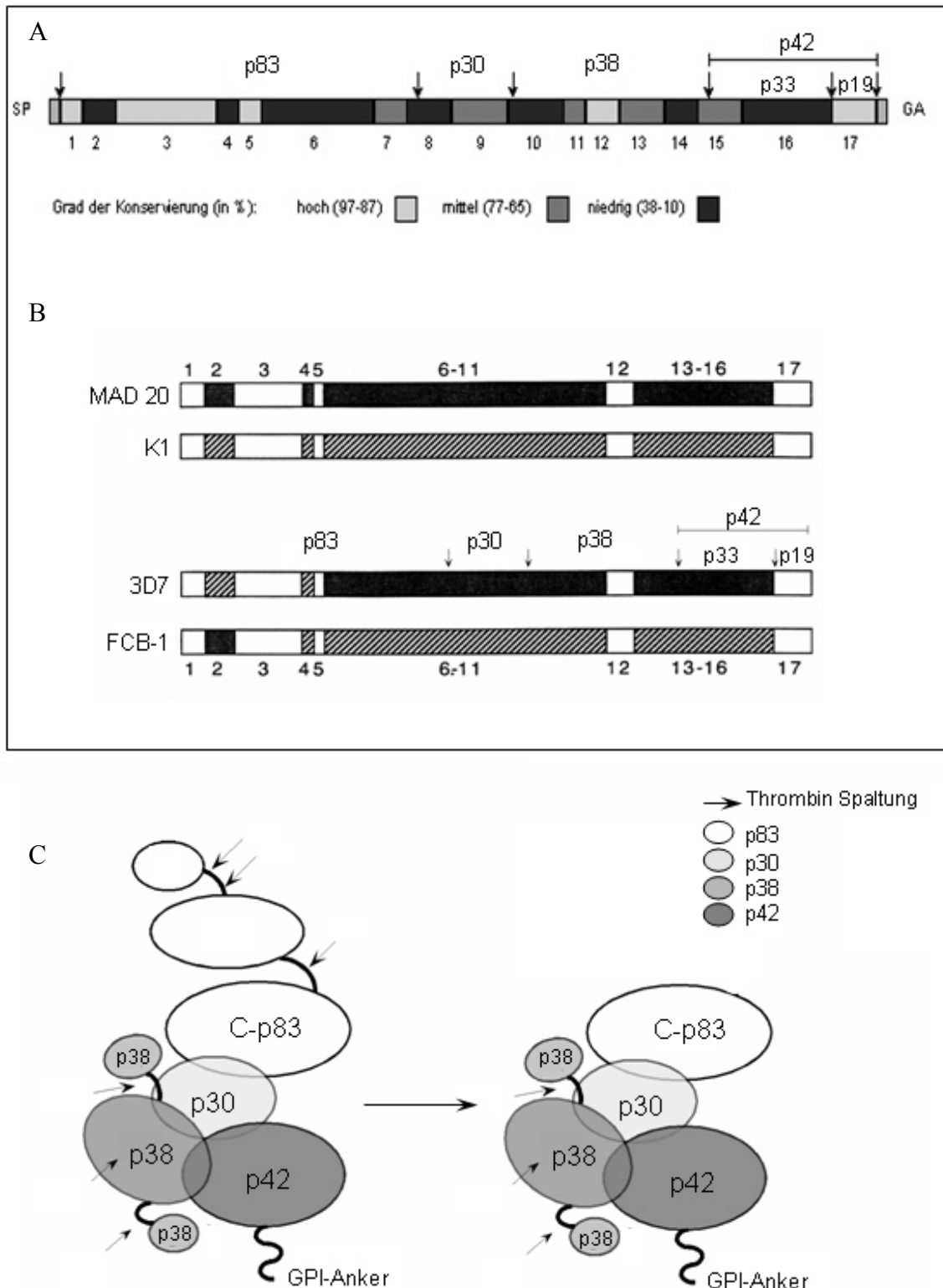


Abb. 1-4 Struktur von MSP-1

A Blockstruktur nach Tanabe (Tanabe et al. 1987): Sequenzierungen verschiedener MSP-1 Allele ergaben Bereiche unterschiedlicher Sequenzhomologie innerhalb verschiedener *P. falciparum* Stämme. Die Abb. zeigt schematisch die Einteilung von MSP-1 in Sequenz-Blöcke unterschiedlichen Konservierungsgrades. Pfeile weisen auf proteolytische Schnittstellen hin, die zu primären (p83, p30, p38, p42) und sekundären (p33, p19) Prozessierungsfragmenten führen. SP, Signalpeptid; GA, Signalsequenz für die Anheftung des GPI-Ankers. **B Sequenzdimorphismus der synthetischen *msp-1*-Gene**: Schematische Darstellung der Sequenzzugehörigkeit

von *msp-1* Genen der in unserem Labor verwendeten FCB-1 und 3D7-Isolate zu den Allelprototypen K1 und MAD-20. Unterschieden wird zwischen konservierten, dimorphen und variablen Bereichen. Bis auf Block 2 entspricht FCB-1 dem K1-Typ, während die 3D7-Version bis auf Block 2 und Block 4 den MAD-20 Typ repräsentiert. **C Modell für die Gesamtstruktur des prozessierten MSP-1:** Dargestellt sind die natürlichen Prozessierungsfragmente in Weiß- und Grauschattierungen vor und nach Thrombin-Verdau. Regionen in denen die Untereinheiten interagieren sind als überlappend dargestellt. Linker-Regionen, die von der Protease Thrombin gespalten werden, sind als schwarze Linien gezeichnet. Die eigentliche Position der Thrombin-Schnittstellen wird durch Pfeile angezeigt. Der N-terminale Teil von p83 wird durch Thrombin Verdau freigesetzt. Übrig bleibt der C-terminale Teil von p83 (C-83), der mit p30 interagiert. Ebenfalls an p30 binden p38 und p42, die ebenfalls miteinander interagieren. Der N-terminale Bereich von p38 wird abgespalten, wenn nicht vorher an der Schnittstelle des C-terminalen Teils von p38 geschnitten wurde. Ob der C-terminale Bereich von p38 tatsächlich dissoziiert war nach den Daten von Kauth et al. nicht zu bestimmen.

1.3.4 Warum ist MSP-1 ein guter Impfstoffkandidat ?

Antikörpertiter korrelieren mit Schutz vor Reinfektion

Bei der Evaluierung von MSP-1 als Impfstoffkandidat sind Feld-Studien in endemischen Gebieten interessant, um die natürliche menschlichen Immunantwort gegen den Komplex zu charakterisieren. In einer Studie in Mali wurde zum ersten Mal eine Korrelation zwischen Antikörpertitern gegen einen Bereich von MSP-1 und Schutz vor Reinfektion und hoher Parasitaemie gefunden (Tolle et al. 1993). Diese Region befand sich in einem dimorphen Teil der p83 Untereinheit von MSP-1. Eine weitere Studie in Westafrika assoziierte in zwei Populationen von Kindern klinische Immunität gegen *P.falciparum* Malaria mit Serumantikörpern gegen die C-terminalen EGF-Domänen des p19 (Egan et al. 1996). Antikörper gegen p19 konnten aus dem Serum von immunen Erwachsenen aufgereinigt werden und hemmten bei physiologischer Antikörperkonzentration in vitro das Parasitenwachstum (Egan et al. 1999). Doch auch andere Regionen des MSP-1-Moleküls erscheinen für Immunität relevant zu sein. Conway et al. zeigte vor kurzem, daß Serum IgG Antikörper endemischer Populationen gegen Block zwei von MSP-1 mit Schutz vor *P. falciparum* korrelieren (Conway et al. 2000). Tolle et al. fand in der oben erwähnten Studie in Mali ebenfalls, daß der polymorphe Block 2 von MSP-1 immunogen ist (Tolle et al. 1993). Die humane Antikörperantwort scheint insgesamt hauptsächlich gegen nicht-konservierte MSP-1 Regionen gerichtet zu sein (Früh et al. 1991).

Immunisierungsversuche mit MSP-1

Aufgrund der Korrelationen von Serumantikörpern gegen MSP-1 mit Schutz vor *P.falciparum* Malaria wurden eine Reihe von Immunisierungen mit MSP-1 durchgeführt.

Immunisierungen mit aufgereinigtem *P. yoelii* MSP-1 schützten Mäuse vor einer Infektion mit dem Parasiten (Holder and Freeman 1981). Auch rekombinant hergestellte Teilfragmente von MSP-1 wie p19 oder p42 konnten eine protektive Immunantwort erzeugen. (Ling et al. 1994; Hirunpetcharat et al. 1997; Tian et al. 1997). Reduziertes MSP-1 konnte jedoch nicht mehr vor *P.yoelii* schützen, so daß intakte Disulfidbrücken der zwei EGF-ähnlichen Domänen für den Immunisierungserfolg wichtig sind (Locher and Tam 1993). Man kann das mit der Tatsache erklären, daß es bekanntermaßen konformationelle Antikörper gegen gefaltete EGF-Domänen gibt, die die zweite Prozessierungsstelle von MSP-1 blockieren und damit eine Invasion des Parasiten verhindern (Blackman et al. 1994; Daly and Long 1995).

Die überzeugendsten Hinweise, daß MSP-1 zu einer protektiven Immunantwort beiträgt, kommen jedoch aus in-vivo Experimenten an Affen. In einem ersten Experiment

konnten mit nativem MSP-1 geimpfte Aotus Affen vor einer tödlichen *P. falciparum* Infektion geschützt werden (Siddiqui et al. 1987). In den nachfolgenden Jahren versuchte man, dieses Ergebnis erneut mit nativem MSP-1 und mit rekombinant produzierten MSP-1 Fragmenten (p19 oder p42) zu reproduzieren. Der Grad der Protektion mit nativem MSP-1 war hoch, während die Immunisierungserfolge mit rekombinanten Fragmenten variabel ausfielen (Etlinger et al. 1991) (Holder et al. 1988; Herrera et al. 1990; Herrera et al. 1992; Kumar et al. 1995; Egan et al. 2000; Stowers et al. 2001). Erfolgreich verliefen Immunisierungen mit aus Baculoviruskulturen aufgereinigtem p42 in Aotus nancymai Affen (Chang et al. 1996; Stowers et al. 2001; Stowers et al. 2002). Auch ein Impfstoff aus den Blöcken drei und vier von MSP-1 fusioniert an ein universelles T-Zell Epitop aus CSP zeigte Schutzwirkung in Aotus griseimembra Affen (Herrera et al. 1992). Impfstoffe, die auf p19 basierten, waren weniger effektiv und konnten die Parasitenvermehrung anfänglich zwar verlangsamen, aber die Affen in den meisten Studien nicht schützen. Eine Vakzine aus Hefe-exprimiertem p19 fusioniert an T Helferzell Epitope des Tetanus Toxoid, wurde allerdings bereits auf Sicherheit und Immunogenizität getestet. Eine partiell protektive Wirkung dieses Impfstoffes konnte bei *Aotus nancymai* nachgewiesen werden (Egan et al. 2000; Kumar et al. 2000). In einer Phase I Studie wurden Malaria naive Freiwillige immunisiert. Zwar induzierte die Immunisierung eine starke CD4⁺ T-Zell Lymphokin Antwort gegen p19, doch die Antikörpertiter der Immunisierten fielen niedrig aus (Keitel et al. 1999; Lee et al. 2002). Zwei Phase I Studien und ein Phase II Versuch wurden auch mit einer drei-Komponenten Vakzine durchgeführt, die aus rekombinant hergestelltem Block 3 und 4 von MSP-1, MSP-2 und Teilen von Ring-infected-erythrocyte-surface-antigen (RESA) besteht (Saul et al. 1999; Lawrence et al. 2000; Genton et al. 2002). Bei den geimpften und anschließend infizierten Freiwilligen der Phase II Studie konnte keine sich verlangsamt entwickelnde oder reduzierte Parasitämie festgestellt werden (Lawrence et al. 2000).

Eine stabile Expression des Proteins MSP-1 in seiner vollen Länge war bis vor kurzem in heterologen Expressionssystemen wegen des hohen AT Gehalts des Gens nicht möglich, so daß man sich auf Teilfragmente beschränken mußte. Aus diesem Grund fanden die meisten Immunisierungen mit p19 oder p42 statt. Eine Neusynthese der beiden dimorphen Typen von MSP-1 mit einem verringerten AT Gehalt behob das Problem, so daß das ganze Protein und die Prozessierungsfragmente in *E. coli* rekombinant hergestellt werden können (Pan et al. 1999). Die in unserem Labor synthetisierten Gene entstanden auf der Grundlage der *msh-1* Sequenz des FCB-1 bzw. 3D7 Isolats von *P. falciparum*, die zum Großteil den K1 bzw. MAD-20 Allelotyp repräsentieren. In Abb. 1-4, B sind die synthetischen Gene in ihrem Sequenzdimorphismus dargestellt.

1.4 Ziele der Arbeit

Für die Entwicklung eines MSP-1-basierten Impfstoffs ist es wichtig, immunogene Bereiche des Proteins zu identifizieren. Dies ist Ziel der vorliegenden Arbeit.

MSP-1 wird zum ersten Mal im Leber-Stadium des Parasiten exprimiert, so daß prinzipiell eine Aktivierung des zellulären Arms des Immunsystems in Form von CD8⁺ T-Zellen möglich ist. Tatsächlich konnte in Freiwilligen, die mit γ -bestrahlten Sporoziten immunisiert wurden, eine proliferative T-Zell Antwort nachgewiesen werden (Krzych et al. 1995). Es ist ebenfalls gut dokumentiert, daß MSP-1 als Oberflächenprotein auf Merozoiten eine Antikörperantwort induziert. Für unseren experimentellen Impfstoff sollten daher

immunodominante und immunogene Bereiche des Proteins identifiziert werden, die für die humorale Immunantwort aber auch für die CD8⁺ T-Zell Aktivierung wichtig sind.

In vorangegangenen prospektiven und longitudinalen Studien in unserem Labor wurde bereits die humorale Antwort gegen überlappende kleine Fragmente des MSP-1 Proteins in einer hyperendemischen Region in Mali analysiert (Muller et al. 1989; Fruh et al. 1991; Tolle et al. 1993). Die inzwischen mögliche rekombinante Herstellung der natürlichen Prozessierungsfragmente eröffnete die Möglichkeit, die humorale Immunantwort der hyperendemischen Region in Mali neu zu evaluieren. Hierzu sollten die Titer MSP-1 spezifischer Antikörper mittels ELISA bestimmt werden.

Zur Identifizierung von Epitopen, die von MSP-1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen erkannt werden, wurden zwei Strategien verfolgt. Mit der ersten Strategie sollte vor allem die Auswirkung der intrazellulären Prozessierung von MSP-1 auf die Auswahl der von HLA-A*0201 Molekülen präsentierten Peptide untersucht werden. Die Epitop-Vorhersage hat sich in den letzten Jahren sehr verbessert. Allerdings bleiben Komponenten wie Stabilität der entstehenden MHC/Peptid Komplexe und die Prozessierung der Proteine bei Computermodellen unberücksichtigt, die auf die MHC-Bindungsfähigkeit, von Peptiden beschränken. Deswegen, sollte eine transgene HeLa Zelllinie hergestellt werden, die MSP-1 Tetrazyclin reguliert exprimieren kann und MSP-1 spezifische Epitope auf HLA-A*0201 präsentiert. In einer Kooperation mit der Gruppe von Prof. Rammensee unter der Leitung von Priv. Doz. Stefanovic (Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) sollten MSP-1 Epitope mit dem „Serial-Epitop-Detection-System“ identifiziert werden. Hierbei werden Peptid-MHC-Komplexe aufgereinigt und anschließend im Massenspektrometer die Aminosäuresequenz der Peptide analysiert. So sollte die intrazelluläre Prozessierung von MSP-1 abgebildet und hinsichtlich der Epitopauswahl für die Impfstoffentwicklung bewertet werden. In einem zweiten Ansatz sollten die identifizierten Epitope mit einer computergestützten Peptid-Motiv-Vorhersage verifiziert werden, die die Bindungsfähigkeit der einzelnen Peptide an den HLA-A*0201 Rezeptor berechnen kann.

Die mit diesen beiden Methoden bestimmten Peptide sollten mittels eines Mausmodells auf ihre immunogenen Eigenschaften getestet werden. Hierzu sollten Mäuse verwendet werden, die transgen für den humanen HLA-A*0201 Rezeptor sind (Pascolo et al. 1997). Diese Mäuse sollten mit MSP-1 exprimierenden viralen Vektoren (Modified-Vaccinia-Ankara) immunisiert werden um die CD8⁺ T-Zell Antwort gegen MSP-1 Epitope zunächst in IFN- γ Elispot Assays zu bewerten.

Zusätzlich sollte die Tetramer-Technologie etabliert werden, die eine weitere Analyse der CD8⁺ T-Zell auf quantitativer Ebene erleichtern sollte. Mit dieser Methode kann man sowohl quantitativ CD8⁺ T-Zell Reaktionen gegen MSP-1 Epitope erfassen als auch die Entwicklung einer Immunantwort während eines Immunisierungsprotokolls verfolgen.

2 Abkürzungen und Definitionen

2.1 Abkürzungen

AA	Acrylamid
Abb.	Abb.
Ak	Antikörper
AMA-1	Apikales Membranantigen-1
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
β 2m	β 2-mirkoglobulin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bis-AA	N, N'-Methylen-Bisacrylamid
BSA	Rinder-Serumalbumin („Bovine serum albumine“)
C-terminal	Karboxyterminal
CM	Chloramphenicol
CTP	Cytosintriphosphat
CTL	Zytotoxische T-Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
Dox	Doxyzyklin
EBA-175	175 kDa Erythrozytenbindendes Antigen
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
ESI	Elektrospray Immunisierung
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (Fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFP	Green-Fluorescent-Protein
h	hour
hc	heavy chain
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
His	Histidin
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IBs	Einschlusskörperchen („inclusion bodies“)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IPTG	Isopropyl-thio-D-Galaktopyranosid
IRES	Interne-Ribosomenbindestelle
Kan	Kanamycin
LB-Medium	Luria-Broth Medium
mAK	Monoklonaler Antikörper
MHC	„major histocompatibility complex“
MS	Massenspektrometrie
MSP-1	Merozoitenoberflächenprotein-1 („merozoite surface protein-1“)
MVA	Modified-Vaccina-Virus-Ankara
MW	Molekulargewicht („molecular weight“)
N-terminal	Aminoterminal
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauchlorid
NP 40	Nonident P 40
NTP	Ribonukleotidtriphosphate
OD	Optische Dichte
ORF	Open-reading-frame
ori	Replikations-Ursprung („origin of replication“)
p	Plasmid
p(Zahl), z.B. p42	Protein mit entsprechendem Molekulargewicht in kDa
<i>P. falciparum</i>	Plasmodium falciparum
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate buffered saline“, isotonischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase A	Ribonuklease A
RT	Raumtemperatur
rtTA	reverse Transaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERP	Serinreiches Protein
sog.	sogenannt
ssDNA	einzelsträngige DNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
Tab.	Tabelle
TBS	„Tris buffered saline“, isotonischer Tris-Puffer
TBST	„Tris buffered saline“ + Tween 20
TCR	T-Zell-Rezeptor
<i>T. gondii</i>	Toxoplasma gondii
TEMED	Triethylmethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tTA	Transaktivator
TX 100	TritonX 100
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
Vol.	Volumen
z. B.	zum Beispiel

wt Wildtyp

2.1.1 Einheiten

A	Ampere
Bp	Basenpaar(e)
Da	Dalton
g	Gramm/Erddanziehungskraft
h	Stunde(n) (lat. „hora“)
kD	Kilodalton
l	Liter
Mol	ca. $6,023 \times 10^{23}$ Moleküle
U	Einheit der Enzymaktivität („unit“)
Upm	Umdrehungen pro Minut
V	Volt

2.1.2 Vorsätze

k	kilo	10^3
m	milli	10^{-3}
μ	mikro	10^{-6}
n	nano	10^{-9}
p	piko	10^{-12}
f	femto	10^{-15}

2.1.3 Basen/Nukleoside

A	Adenin/Adenosin
C	Cytosin/Cytidin
G	Guanin/Guanosin
T	Thymin Thymidin
U	Uracil/Uridin

2.1.4 Nomenklatur der Aminosäuren nach IUPAC-IUB Vereinbarungen (1969)

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leuzin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Gln	Q	Glutamin	Ser	S	Serin
Glu	E	Glutaminsäure	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glyzin Trp	W		Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	T	Tyrosin
Ile	I	Isoleuzin	Val	V	Valin

2.2 Definitionen

In dieser Arbeit wurden zum Teil englische Fachausdrücke beibehalten, da entweder keine sinnvolle, oder nur eine umständliche Übersetzung ins Deutsche möglich ist.

„blocking“	Absättigung unspezifischer Bindungsstellen
Blot	Transfer von Protein, DNA oder RNA auf Membranen
„blunt-end“	„glattes“, nicht überhängendes DNA-Ende
„boost“	Wiederholte Immunisierung mit dem gleichen Antigen
Maxipräp	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus <i>E.coli</i> mit hoher DNA-Ausbeute
Minipräp	Schnellmethode zur Plasmid-DNA-Isolierung und Aufreinigung aus <i>E.coli</i> mit geringer DNA-Ausbeute
Pellet	Sediment
Primer	Oligo(desoxy)nukleotide, die nach Paarung mit dem komplementären DNA-Strang bei der enzymatischen DNA-Synthese als Startstelle dient
Tag	Sequenz zur Aufreinigung über Affinitätschromatographie
„repeat“	sich wiederholendes Sequenzmotiv
„well“	Vertiefung in einer Zellkultur- oder Reaktionsplatte
Western-Blot	Proteintransfer vom PAA-Gelen auf Nitrozellulose-oder PVDF-Membranen

3 Material

3.1 Laborausstattung

Brutschrank B5060 EC/CO2

Computer-Hardware:

Scanner „Linoscanner“

Computer-Software:

Adobe Photoshop 5.0

Canvas 7

Cell Quest 4.0

DNASStar

DNA Strider 1.3

EndNote 5

Excel 2001

IPLabs 3.0

MS Word 2000

MacPlasmap 2.05

Netscape Navigator 6.2

Powerpoint

Cryo Einfrier-Behälter

Durchlichtmikroskop

Elektrophoreseapparaturen

Elektroelutionsapparatur

ELISA-Reader

FACSscan

Feinwaage

Fluoreszenzmikroskop Leitz DMR

Flußchromatographiesysteme:

„Äkta Purifier 100“

„Äkta Basic“

Säulenkörper und Zubehör

Durchflussszytometer „FACSscan“

Fotoschale

French-Pressure-Cell

Gasbrenner GASI 3.340

Gefrierschrank -80° C

Geltrockenrahmen

Grobwaage Typ 1474

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B, RC-3B

Labor pH-Meter

Leuchtplatte Rex

Lichtmikroskop Labovet

Magnetrührer

Mikrowellenherd

Gelelektrophoreseapparatur

Netzgerät ECPS 3 000/150

Netzgerät LKB 2103 & 2197

Peristaltikpumpe P-100

Pipetman Gilson P2, P20, P200, P1000

Pipettierhilfe R.301

Rotoren SS-34, GSA, GS-3, SA 600

Schüttelinkubator

Schüttler Eppendorf 5432

„Sonifier Cell Disruptor“

Speed-Vac-Concentrator Savant

Spektrophotometer Ultrospect III

Heraeus GmbH, Hanau

MacIntosh iBook, Laserwriter Plus

Heidelberger Druckmaschinen

Adobe Systems Inc., USA

Deneba Software Inc., Miami, USA

Becton Dickinson

DNASStar Inc., USA

Commisariat a l'Energie Atomique, France

Niles&Associates Inc., CA, USA

Microsoft Corporation, CA, USA

Signal Analytics Inc., CA, USA

Microsoft Corporation, CA, USA

Jingdong Liu; Salt Lake City, USA

Netscape Communications Corp., USA

Microsoft Corporation, CA, USA

Nalgene, Nunc International

Leitz, Wetzlar

ZMBH, Heidelberg

ZMBH, Heidelberg

MWG, Ebersberg

Becton-Dickinson

Sartorius, Göttingen

Leica; Wetzlar

Amersham Bioscience, Freiburg

Amersham Bioscience, Freiburg

Amersham Bioscience, Freiburg

Becton-Dickinson, Heidelberg

Migge, Heidelberg

Schütt, Göttingen

Labotech

Promega, USA

Mettler, Göttingen

DuPont, Bad Homburg

Knick

Messinstrumentebau GmbH, Erlangen

Leitz; Wetzlar

Bachofer; Degerschlacht

Phillips

Biometra,

Pharmacia, Dübendorf, Schweiz

LKB, Bromma, Schweden

Amersham Bioscience, Freiburg

Abimed; Düsseldorf

Tecnomara, Zürich

DuPont, Bad Homburg

Infors AG, Basel, Schweiz

Migge, Heidelberg

Branson über Heinemann, Heidelberg

Bachofer, Reutlingen

Pharmacia

Steril-Werkbank
Stickstofftank BT 40
Thermocycler „Robocycler“
Thermoschüttler ISF-1-V
Tischschüttelinkubator Typ 82/180
Tischzentrifuge, Biofuge A
Transluminator UVF
Ultrafiltrationszelle (Amicon 8050)
Ultrazentrifuge TLA 100
UV-Handlampe Typ 70 481
UV-Stratalinker
Vakuumpumpe, Beta
Videosystem CS 1
Vortex-Genie
Wasserbad, U3/7A
Wasserbad, 1002
Zellkulturzentrifuge Rotanta/RP
Zentrifuge Mikrorapid K

BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
L'air Liquide
Sratagene, Amsterdam
Adolf Kühner AG; Schweiz
Infors AG, Basel, Schweiz
Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz
Herolab; Wiesloch
Millipore
Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA
Reichelt,
Stratagene, Amsterdam
Heraeus Christ AG, Zürich, Schweiz
Cybertech; Berlin
Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Julabo, Seelbach
GFL, Burgwedel
Hettich; Tuttlingen
Hettich, Tuttlingen

3.2 Verbrauchsmaterialien

3MM Chromatographiepapier
Coomassie-Blau
Cytofix/Cytoperm+ Golgiplug
Dialysemembranen Spectra/Por 1, 2 und 4
Einmachfolie „Alba“
ELISA „96 well“-Platten
Eppendorf-Reaktionsgefäße 3810
Falcon Steril-Röhrchen (50ml, 15ml)
Filtrationsmembran (Typ GS 0,22µm)
Handschuhe Glovex
Jetstar-DNA-Chromatographiesäulen
Konzentratorröhrchen „vivaspin 500“
Objektträger
Pasteurpipetten
Pipettenspitzen für P1000
Pipettenspitzen für P2, P20, P200
PVDF-Membran „Immobilon-P“
QIAquick-spin PCR Reinigungssäulen
Quarzglas-Küvetten
Zell-Filter(Aufsatz für Falcon)(40µm/Blau)

Vetter, St.Leon-Rot
Serva, Heidelberg
BD Biosciences
Roth, Karlsruhe
Gehring + Neiweiser, Bielefeld
Nunc GmbH
Eppendorf, Hamburg
Falcon, Heidelberg
Millipore
Beiersdorf, Hamburg
Genomed
Vivascience, UK
Menzel Gläser, über Migge; Heidelberg
Migge, Heidelberg
Bayer, Mannheim
Abimed, Düsseldorf
Millipore, Eschborn
Qiagen; Hilden
Hellma, München
BD, Falcon

3.3 Chromatographiemedien

Protein A Sepharose 4 Fast Flow,
Chelating Sepharose 4 Fast Flow,
Superdex 200 HR 10/30
Superdex 75 (HiLoad 16/60)
Glutathion-Sepharose 4 Fast Flow
GSTrap (1ml und 5ml)
Hi-Trap Protein G HP (1ml)
Hi-Trap Desalt 5ml
Hi-Prep 26/10 Desalting
Hi-Trap Chelating (1 ml und 5 ml)

Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg
Amersham Bioscience, Freiburg

3.4 Chemikalien

Acrylamidlösung 40% (37,5 : 1)
Agarose
Ampicillin

Applichem, Darmstadt
Life Technologies, Scotland
Sigma, Deisenhofen

(L-)Arginin	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Labs, Detroit USA
Bacto-Trypton	Difco Labs, Detroit USA
Biuret-Reagenz „BioQuant“	Merck, Darmstadt
Bradford „Protein Assay“	BioRad, München
Bradford „Protein Assay DC“	BioRad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg
Complete Mini Proteaseinhibitoren	Roche, Mannheim
DMP (Dimethylpimelimidat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DTT	Serva, Heidelberg
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Formaldehyd (37%)	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd (70% in H ₂ O)	Sigma, Deisenhofen
Glutathion oxidiert	Sigma, Deisenhofen
Glutathion reduziert	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe
IPTG	Biomol, Hamburg
Leupeptin	Roche
NBT/BCIP-Tabletten	Roche, Mannheim
NP-40 (als Igepal CA 630)	Sigma, Deisenhofen
SDS	Serva, Heidelberg
Pefabloc SC	Boehringer, Mannheim
Pepstatin	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Propidiumiodid	Molecular Probes
Protein-Standard	Sigma, Deisenhofen
TLCK	Sigma, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Trypan-Blau	Sigma

3.5 Enzyme

Biotin Protein LigaseBirA	Avidity
Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
DNase I	Serva, Heidelberg
Pwo DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim
	Amersham Bioscience, Freiburg
	New England Biolabs; Schwalbach
RNase A	Serva, Heidelberg
T7 DNA Polymerase	Pharmacia, Freiburg
T4 DNA-Ligase	Roche, Mannheim

3.6 Seren und Antikörper

Ratte anti-Maus-IFN- γ	Klon RMMG-1, Biosource Europe
Biotin-konjugiert Ratte anti-Maus IFN- γ	Klon XMG1.2 BD Pharmingen
anti-Human IgG-AP	Promega
Idiotyp-Kontrolle Maus-IgG1-APC	Klon MOPC-21, BD
Idiotyp-Kontrolle Ratte-IgG1-APC	Klon R3-34, BD
Idiotyp-Kontrolle Ratte-IgG2a-FITC	Klon R35-95
Idiotyp-Kontrolle Maus IgG1-FITC	Klon MOPC-21, BD
Maus IgG1 anti-Human-IFN- γ -APC	Klon B27, BD
Ratte IgG1 anti-Maus-IFN- γ -APC	Klon XMG1.2, BD

Ratte anti-Maus Fc-Block	BD
Ratte IgG2a anti-Maus-CD8a-FITC	BD
Maus IgG1 anti Human-CD8-FITC	BD
anti-Maus-CD3	kein Azid!, BD
anti-Human-CD3	kein Azid!BD
Maus anti-HLA-A,B,C IgG2a-FITC (W6/32)	Dr. Moldenhauer, DKFZ, Heidelberg
mAk 5.2	Dr Hui, University of Hawaii, USA
Kaninchen Serum anti-d-HX30	Charles River
Kaninchen Serum anti-d-HX42dEGF	Charles River
Kaninchen Serum anti-dHX42	Charles River
anti-His-Tag	Roche

3.7 Primer (5'- 3°)

3.7.1 Klonierungen

Hygromyzin 1a	-CCATGGGAAAGCCTGAACTCACCGCGACG
Hygromyzin 1b	-GGAAAGAAGCGGCCGCTCAGTTAGCCTCCCCATCTC-
Oligo1forward	-TCGACATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTA TTGGCGCGCCACGCGTATAACTTCGTATAGCATACATTA TACGAAGTTATACTAGTGCGGCCGCT-
Oligo1reverse	-CTAGAGCGGCCGCACTAGTATAACTTCGTATAATGTAT GATATACGAAGTTATACGCGTGGCGCGCCAATAACTTCG TATAATGTATGCTATACGAAGTTAT-
Oligo2forward	-CTAGTACCATGGGATCCATCGATTCCGGAT-
Oligo2reverse	-CTAGAATCCGGAATCGATGGATCCCATGGT-
p38fXaup	-GGCCATCGATATCGAAGGTCGTAACGACGACACCTCTCACTC-
p38fXadown	-GGTTCTGCAGTTACTCACCGGTGACCACCT-
p42f1ClaXaA	-GGCCATCGATATCGAAGGTCGTGCTGTCACTCCTTCCGTGATT-
p42f1HindIIIB	-GCCCAAGCTTTTAATTAGAGCTGGAGCAA-
p42XbaIB	GCTCTAGATTAATTAGAGCTGGAGCAAATC-
p19fClaIXaA	-GGCCATCGATATCGAAGGTCGTAACATCTCCCAGCACCAATGC-
p83fClaXaA	-GGCCATCGATATCGAAGGTCGGTGACCCACGAATCCTATCAG-
p83f1B	-GGTTCTGCAGTTAGAACACTTTTCAGTTTGTC-
p190fdEGFPvuIIA	-GGTCTCTCAAGAAACAGCTGGAG-
p190fEGFHindIIIXbaIB	-GCCCAAGCTTTCTAGATTATTGGTGCTGGGAGATGTTC-
p42fEGFSspBIA	-CGAAACCCTGTACAAGACAGTG-
p30dClaXaup	-GGCCATCGATATCGAAGGTCGTAGCGAGACAACCGAAG ATGG-
p30Pstdown	-GGTTCTGCAGTTACGTCCCAGTTATCTGTTTCTG-

3.7.2 Sequenzierungen

e*dGFP	-GACGGCAACATCCTGGGG-
pUHR(1.7)36-CLfo	-ACGTATGTTCGAGTAGGCGTGT-
pUHR(1.7)36-CLre	-GAAGTTATACGCGTCAGATCT-
pUHR(1.7)36üGFPpre	-ACCTGTCAATACGGCGTC-
pUHR(1.7)3683/30üGFPfo	-AGCAAAGACCCCAACGAGAAG-
pUHR(1.7)36GFPüPromotr	-GGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGG-
pUHR(1.7)3638/42üGFPpre	-TGGTTCTGGGAGTTGGAGTGT-
pUHrtT62-rev	-TATCTTATCATGTCTGGATCT-
pUHrtTIRESHyg-fo	-AGAAGGTACCCCATTTGTATGG-
Zeo forw	-ATGGCCAAGTTGACCAGTGC-
Zeo revers	-TCAAGTCCTGCTCCTCGG-
bla:	-CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC-(β-Laktamasegen-upstream)
T3:	-ATTAACCCTCACTAAAGGGAACA-
T7:	-AATACGACTCACTATAG-

3.8 Verwendete Plasmide

pDS56RBSII, 6 * His, f-42	Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Amp ^R
pDS56RBSII, 6 * His, f-19	Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Amp ^R
pDS56RBSII, 6 * His, f-83	Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Amp ^R
pDS56RBSII, 6 * His, f-30	Stüber, Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz	Amp ^R
pZE13/f-H38		Amp ^R
pcDNA3.1/Zeo	Invitrogen	Amp ^R
pZE21/d-38/42	Nicole Westerfeld, ZMBH, Universität Heidelberg	Kan ^R
pZE21/d-83/30	Nicole Westerfeld, ZMBH, Universität Heidelberg	Kan ^R
pUHD10-1/d190.3		Amp ^R
pCMVlacI	Markus Scheuermann, DKFZ	Amp ^R
SK-N/d2G*	Rainer Löw, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pUHR 1.7(36)-CL	Rainer Löw, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
SK-E/neo	Rainer Löw, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pUHC13-3	Ref.: Gossen und Bujard, 1992	Amp ^R
pUHD16-1	Angelika Bonin, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pUHD34-1	Rainer Löw, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pUHRt 62-1	Mazahir Hasan, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pET3d (hc)	Steffen Walter, Abteilung Immunologie, Uni Tübingen	Chloramphenicol, Amp ^R
pET3a (β2m)	Steffen Walter, Abteilung Immunologie, Uni Tübingen	Amp ^R
pZE13HLA-A*0201hc	Nicole Westerfeld, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R
pZE13β2m	Nicole Westerfeld, ZMBH, Universität Heidelberg	Amp ^R

3.9 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5α:	<i>Δ(lac)U169, endA1, gyrA46, hsdR17(rK-mK+), phi80, Δ(lacZ)M15, recA1, relA1, supE44, thi-1</i> , Dr Rolf Lutz, ZMBH
<i>E. coli</i> Dh5α-Z1	<i>Δ(lac)U169, endA1, gyrA46, hsdR17(rK-mK+), phi80, Δ(lacZ)M15, recA1, relA1, supE44, thi-1, lacI^q, tetR, SP^r</i> , Dr. Rolf Lutz, ZMBH
<i>E. coli</i> W3110-Z1	ATCC Nr.: 27325, <i>lacI^q, tetR, SP^r</i> , Dr. Rolf Lutz, ZMBH
<i>E. coli</i> SG13009	Kanamycin und Ampicillin-resistent, Lac Repressor konstitutiv exprimiert
<i>E. coli</i> C600-Z1	F- <i>supE44, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21, hsdR, lacI^q, tetR, SP^r</i> , Dr. Rolf Lutz, ZMBH
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Stratagene

3.10 Verwendete Zelllinien

HfTA	HeLa-Zelllinie, in welcher der tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator tTA stabil unter der Kontrolle des CMV Promotors exprimiert wird. (Gossen und Bujard, 1992)
HeLa/A2A2D ^b	HeLa-Zelllinie, exprimiert ein chimäres HLA-A*0201 Molekül (Selektionsmarker Neomycin) Ref: (Pascolo et al. 2001)

3.11 Verwendete Mäuse

HHD-2 Mäuse:	HHD+/+, β2m -/-, D ^b -/-; Ref.: (Pascolo et al. 1997)
--------------	--

3.12 Material für die Kultur von *E.coli*

3.12.1 Lösungen für die Kultur von *E.coli*

Antibiotikastammlösungen:	
Ampicillin (Na-Salz):	50 mg/ml in H ₂ O
Kanamycin:	25 mg/ml in Ethanol
Chloramphenicol	10 mg/ml in Ethanol

LB-Medium:	1% Bacto-Trypton
	0,5% Hefeextrakt
	0,5% NaCl

LB-Platten:	LB-Medium
	1,2% Bacto-Agar

3.12.2 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Lösung A:	50mM CaCl
	10mM K-Acetat, pH 6,2

Lösung B:	50mM CaCl
	20% Glycerin
	10mM K-Acetat, pH 6,2

Transformationspuffer:	70mM CaCl ₂ ,
	35mM MgCl ₂

3.13 Material für die Kultur von Zelllinien

Zellkulturmedium	RPMI 1640	10%FCS 1mg/ml Neomycin
------------------	-----------	------------------------

3.14 Material für molekularbiologische Methoden

3.14.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* Bakterien

„Minipräp“-Methode:

Lösung I:	10 mM EDTA
	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
	Rnase A 100ug/ml
Lösung II:	0,2 M NaOH
	1% SDS
Lösung III:	3 M K-Acetate, pH 4,8 (eingestellt mit Eisessig)
TE-Puffer:	1 mM EDTA
	10 mM Tris/HCl, pH 8,0

„Maxipräp“-Methode:

Resuspensionspuffer (E1):	50 mM Tris-HCL pH 8,0
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A

Lysepuffer (E2):	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralisationspuffer (E3):	3,2 M K-Acetat, pH 5,5
Äquilibrierungspuffer (E4):	0,15% Triton X-100 600 mM NaCl 100 mM Na-acetat, pH 5,0 (eingestellt mit Essigsäure)
Waschpuffer (E5):	800 mM NaCl 100 mM Na-acetat, pH 5,0 (eingestellt mit Essigsäure)
Elutionspuffer: (E6)	1,25 M NaCl 100 mM Tris-HCl, pH 8,5

3.14.2 Reaktionspuffer für Enzyme

Ligase-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 10 mM DTT 0,6 mM ATP
----------------	--

Restriktionsendonukleasen:

Puffersystem für Restriktionsendonukleasen der Fa. Roche, MA (10x). Bei abweichenden Bedingungen wurden die Herstellerangaben befolgt.

Puffer A:	330 mM Tris/Ac, pH 7,9 100 mM MgAc 660 mM KAc 5 mM Dithiothreitol
Puffer B:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 50 mM MgCl ₂ 1 M NaCl 10 mM β-Mercaptoethanol
Puffer L:	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithiothreitol
Puffer M:	100 mM Tris/HCL, pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 500 mM NaCl 10 mM Dithiothreiol
Puffer H:	500 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM MgCl ₂ 1 M NaCl

3.14.3 PCR-Reaktionspuffer:

Pwo DNA-Polymerase:	100 mM Tris, pH 8,85 250 mM KCl, 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 mM MgSO ₄
dNTP-Mix:	je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, pH 7,5

3.14.4 Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese von DNA:

Loening-Puffer:	1 mM EDTA 36 mM Tris/HCl 30 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,8
DNA-Probenpuffer:	6% Saccharose 0,01% SDS 0.02% Bromphenolblau 0.02% Orange G 0.02% Xylencyanol FF
Ethidiumbromid-Stammlösung:	10 mg/ml in H ₂ O

3.14.5 Isolierung von DNA aus Agarose Gelen

Silica (Sigma S-5631):	100 mg/ml in 3 M NaI
Resuspensionspuffer:	6 M NaI
Wasch-Puffer:	50 mM NaCl 10 mM Tris/HCl, pH 7,6 2,5 mM EDTA 50% v/v EtOH

3.15 Material für biochemische Methoden

3.15.1 Luziferase-Assay

Luziferase-Meßpuffer	25 mM Glycyl-glycin pH 7,5 15 mM MgSO ₄ 5 mM ATP
----------------------	---

3.15.2 β -Galaktosidase-Nachweis mit X-Gal

X-Gal-Färbelösung	1 mg/ml X-Gal 2 mM MgCl ₂ 5 mM K ₄ (Fe(CN) ₆) 5 mM K ₃ (Fe(CN) ₆)
X-Gal-Stammlösung	100 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (bei -20°C und im Dunklen lagern)

3.15.3 β -Galaktosidase-Quantifizierung mit ONPG

ONPG-Lösung	100 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH 7,5 4 mg/ml ONPG
Z-Puffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ pH 7,5 10 mM KCl 1 mM MgSO ₄ 50 mM β -Mercaptoethanol

3.15.4 Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) von Proteinen

Acrylamid-Stammlösung :	30% Acrylamid 0,8% Bis-Acrylamid (in H ₂ O)
4x „Upper” Tris:	500 mM Tris pH 6,8 0,4% SDS
4x „Lower” Tris:	1,5 M Tris, pH 8,8 0,4% SDS
Sammelgel 4% (10 ml):	1,33 ml Acrylamid-Stammlösung 2,5 ml 4x „Upper” Tris Puffer 6,17 ml H ₂ O 20 µl TEMED 40 µl 10% (w/v) APS
Trenngel 12% (10 ml):	4 ml Acrylamid-Stammlösung 2,5 ml 4x „Lower” Tris Puffer 3,5 ml H ₂ O 20 µl TEMED 40 µl 10% (w/v) APS
SDS-PAGE-Laufpuffer:	250 mM Glycin 0,1% SDS 25 mM Tris, ca. pH 8,3
Probenauftragspuffer:	3% SDS 25% „Upper”-Tris 20% Glycerin 0,02% Bromphenolblau 50 mM DTT (optional)

3.15.5 Coomassie- Färbung

Färbelösung:	50% EtOH 10% Essigsäure 40% H ₂ O dest. 0,25% Serva Blue R gelöst und filtriert
Entfärbelösung:	40% EtOH 10% Essigsäure 50% H ₂ O

3.15.6 Silberfärbung nach Heukeshoven (modifiziert)

Fixierlösung 1:	30% EtOH 10% Essigsäure
Fixierlösung 2:	30% EtOH 0,5M Na-Acetat 0,2% Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O 0,5% Glutaraldehyd
Färbelösung:	0,1% AgNO ₃ 0,02% Formaldehyd
Entwicklerlösung:	3% Na ₂ CO ₃ 0,02% Formaldehyd

Stopplösung: 1% Glycin

Fixierlösung 2, Färbelösung und Entwicklerlösung werden frisch angesetzt.

3.15.7 Lösungen für „Western Blot“

Transfer-Puffer:	0,01% SDS 25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol
TBS-Puffer:	150 mM NaCl 10 mM Tris, pH 8,0
TBST-Puffer:	TBS mit 0,2% Tween 20
Absättigungspuffer:	2% Magermilchpulver in TBST
Entwicklerlösung:	100mg NBT/BCIP-Pulver in 10ml H ₂ O
„stripping“-Puffer	0,1% SDS 1% Tween 20 0,2 M Glycin

3.15.8 Lösungen für die In-vitro-Renaturierung von rekombinanten Proteinen

Lysepuffer für <i>E.coli</i> Bakterien:	20 u/ml DNaseI 10 µg/ml Lysozym in PBS
PBS-Puffer:	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,3
Solubilisierungspuffer:	6 M Guanidiniumchlorid 2 mM EDTA 50 mM DTT 50 mM Tris, pH 8,0
Dialysepuffer:	6 M Guanidiniumchlorid 2 mM EDTA pH 3
Renaturierungspuffer für H42F:	1 M L-Arginin 2 mM EDTA 100 mM Tris, pH 8 10 mM Glutathion reduziert (GSH) 1 mM Glutathion oxidiert (GSSG)
Renaturierungspuffer für HX38F:	1 M L-Arginin 2 mM EDTA 100 mM Tris, pH 8,5 2 mM DTT

3.15.9 Puffer für die chromatographische Reinigung von Proteinen

Puffer für Ni^{2+} -Chelat-Chromatographie

Ni^{2+} -Chelat-Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen:

Puffer Denat. A:	50 mM NaH_2PO_4 , pH8 6 M Harnstoff
Puffer Denat. B:	50 mM NaH_2PO_4 , pH8 6 M Harnstoff 500 mM Imidazol

Ni^{2+} -Chelat-Chromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen:

Puffer A:	50 mM NaH_2PO_4 , pH8 200 mM NaCl
Puffer B:	50 mM NaH_2PO_4 , pH8 200 mM NaCl 500 mM Imidazol 50 mM Tris, pH 8

Regeneration der Chromatographiematrix:

Puffer Reg. A:	50 mM EDTA, pH8.0 500 mM NaCl
Puffer Reg. B:	100 mM NiSO_4

Puffer für Gelfiltrationschromatographie

Säulenpuffer:	20mM Tris HCl 50 mM NaCl, filtrieren, pH 8
---------------	---

Puffer für die Immunaффinitätschromatographie

NET-Puffer:	150 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7,4
NET+NaCl-Puffer:	650 mM NaCl 5 mM EDTA 50 mM Tris, pH 7,4
Elutionspuffer:	100 mM Glycin, pH 2,5
Neutralisationspuffer:	1 M Tris-HCl, pH 8,0

3.16 Material für immunologische Methoden

3.16.1 ELISA

Karbonatpuffer:	0,2 M Na ₂ CO ₃ 0,2 M NaHCO ₃ Vor Gebrauch 17 ml der 0,2 M Na ₂ CO ₃ 8 ml der 0,2 M NaHCO ₃ zusammen mischen ad 100 ml mit H ₂ O, pH 10,6
Waschpuffer:	
Substratpuffer:	4,8 ml Diethanolamin 250µl 2M MgCl ₂ ad 500 ml H ₂ O, pH 9,5 mit HCl einstellen
Blockpuffer:	TBS mit 1% Magermilchpulver 0,02% Na-Azid
Antikörper:	Anti-human IgG AP-Konjugat
Färbereagenz:	15 min vor Gebrauch 1mg/ml p-Nitrophenyl-Phosphat im Substratpuffer lösen
Stopplösung:	0,1 M EDTA

3.16.2 Herstellung von MHC/Tetrameren

Rückfaltung von MHC/Peptide Komplexen

Renaturierungspuffer (250 ml):	100 mM Tris-HCl (3,925 g) pH 8,0 400 mM L-Arginine-HCl (21 g) 2 mM NaEDTA 0,5 mM oxid. Glutathione (0,077 g) 5 mM red. Glutathione (0,385 g)
Guanidine Lösung(100 ml):	3M Guanidine-HCl (28,7 g) pH 4,2 10 mM Na-Acetat (0,082 g) 10 mM NaEDTA (2 ml Stocklösung: 0,5 M)
Protease Hemmer(Stocklösung):	PMSF, 100 mM (174,2 mg in 10 ml 2-Propanol, bei RT lagern) Pepstatin, 2 mg/ml (5 mg in 2,5 ml DMSO, bei -20°C) Leupeptin, 2 mg/ml (5 mg in 2,5 ml dH ₂ O, bei -20 °C)

Ankonzentrieren des renaturierten Komplexes

Austauschpuffer(500 ml):	20 mM Tris HCl (1,57 g) 50 mM NaCl (1,46 g), filtern, pH 8,0
--------------------------	---

Biotinylation

Biotin-Protein Ligase BirA (3 mg/ml)	AVIDITY (www.avidity.com)
--------------------------------------	--

10 µl Aliquots bei -80°C lagern

Solution A (bicine buffer): 0,5 M bicine, pH 8,3

Solution B (ATP, biotin): 100mM ATP, 100mM MgAc, 200µM Biotin

Extra d-biotin (500 µM Biotin)

Gel filtration

Gelfiltrationspuffer (500 ml):	20 mM Tris HCl (1,57 g)
--------------------------------	-------------------------

50 mM NaCl (1,46 g), filtrieren, pH 8,0

Streptavidin-Gelshift Assay

Streptavidin IBA Göttingen, Germany)
 Stock Lösung: 20ml/ml in PBS, 0.02% NaAzid, lagern bei 4°C

Multimerization

Streptavidin-Phycoerythrin MolecularProbes www.molecularprobes.com

3.16.3 Intrazelluläre Zytokinanfärbung

Kit: Cytofix/Cytoperm
 Antikörper: Idiotyp-Kontrollen und anti-CD8; anti-IFN- γ
 Färbepuffer: Dulbecco's PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} , 1% FCS(Hitze-inaktiviert, hi), 0,09 % NaAzid pH7-4-7,6, filtern 0,2 μ m), 4 °C

Waschpuffer und FACS-Puffer : PBS, 0,5 % BSA, 2mM EDTA
 Medium: MEM α , 10% FCS, 1% Pen/Strep
 PBS-Puffer: 8,1 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0
 1,5 mM KH_2PO_4
 137 mM NaCl
 2,7 mM KCl

PBS(EDTA)-Puffer: 16 mM Na_2HPO_4
 1,5 mM KH_2PO_4
 140 mM NaCl
 2,7 mM KCl
 0,8 mM EDTA

PFA-Puffer 4g Paraformaldehyd pro 100 ml PBS
 (1 Stunde bei 60°C gelöst und bei -20°C gelagert)

3.16.4 ELISpot-Assay

Antikörper: anti-Maus IFN- γ (Biosource); Biotin-konjugiert anti-Maus IFN- γ
 Milzisolierung:
 HBSS-Lösung HBSS + 3% FCS, 4 °C

AKR-Erythrozyten-Lyse-Puffer 8,29g NH_4Cl , 1g $KHCO_3$, 37,2mg Na_2EDTA (Titrplex)
 ad 800 ml H_2O , dann pH 7,2-7,4 einstellen und auffüllen auf 1l

Medien: MEM α , 10% FCS, 1% Pen/Strep
 MEM α , 5 % FCS, 1% Pen/Strep, 5ml Hepes, 4 °C

Karbonatpuffer: A: $NaHCO_3$ (1,59 g) ad 100ml H_2O
 B: Na_2HCO_3 (2,93g)ad 100 ml H_2O
 Pro 96-wellPlatte 1 ml A + B + 8 ml Aqua dest.,
 auf pH 9,6 einstellen

Waschpuffer: PBS-EDTA,
 0,025 % Tween20 (1,25 ml ad 500 ml H_2O)

Verdünnungspuffer für Antikörper: PBS-EDTA, 1 % BSA, 4 °C

Verdünnungspuffer für Peroxidase
 konjugiertes Streptavidin: Wasch-Puffer + 5 % FCS

Material _____

AEC-Lösung:

AEC Tabletten (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol; Sigma

1 Tablette in 2,5 ml DMF (Dimethylformamid) auflösen – dann:

2,5 ml AEC-DMF + 47,5 ml Na-Acetat-Puffer, pH 5,0

74 ml 0,2 M Essigsäure

176 ml 0,2 M NaAcetat, ad 1l Aqua dest.

kurz vorher 25 µl frisches H₂O₂ (30 % Stammlsg.) zugeben

4 Methoden

4.1 DNA-Transfer in *E.coli*-Zellen

4.1.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für die CaCl_2 -Methode

Alle Arbeiten sollten im Kühlraum durchgeführt werden und alle Lösungen vorgekühlt werden.

- Von einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wird zunächst eine Übernachtskultur (ÜNK) in 5 ml LB-Medium aufgewachsen.
- Mit 2ml dieser Übernachtskultur 500 ml LB-Medium animpfen
- Inkubation bei 37° C im Schüttelinkubator (180-200Upm) und aufwachsen bis $\text{OD}_{600} = 0,3 - 0,4$
- Bei Erreichen der Zelldichte wird die Kultur für 15 min in Eiswasser abgekühlt
- Sedimentation der Zellen in der Kühlzentrifuge (5 min, 500 Upm, 4°C)
Überstand wird verworfen.
- Zellen vorsichtig in 250 ml (1/2 Vol Ausgangskultur) eiskalter Lösung A (CaCl_2) resuspendieren.
- 30 min auf Eis inkubieren
- Sedimentation der Zellen in der Kühlzentrifuge (5 min, 500 Upm, 4°C)
- Überstand verwerfen und Zellen in 25 ml eiskalter Lösung B (1/10 Ausgangskultur) vorsichtig resuspendieren.
- Portionieren in Aliquots von 0,5 ml in Eppendorf-Röhrchen
- Sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren
- Bei -80° C lagern

4.1.2 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen nach der CaCl_2 -Methode

Die kompetenten Zellen langsam auf Eis auftauen.

Mischen der kompetenten Zellen mit eisgekühltem Transformationspuffer im Verhältnis 1:1

- 200 μl (ca $2 \cdot 10^8$ Zellen) kompetente Zellen zu etwa 0,1 pmol Plasmid-DNA eines Ligierungsansatzes oder 0,01 pmol superhelikaler DNA geben
- 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock bei 42°C für 1-2 min zur Erhöhung der Transformationseffizienz
- Auf 10-15 min Eis abkühlen
- Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium folgt die phänotypische Expression des Resistenzmarkers. 1 Stunde bei 37° C inkubieren
- Bakterien 30s bei 6000 Upm zentrifugieren
- 1ml des Überstandes verwerfen, Pellet im Rest resuspendieren
- Ausplattieren auf selektivem LB-Agar

4.1.3 Schnelltransformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* Zellen

Dieses einfache und schnelle Transformationsprotokoll, beschrieben von (Pope and Kent 1996), reduziert das Standardverfahren der Transformation (s.o.) auf nur wenige Minuten. Die DNA wird dabei mit 200 μl Zellsuspension kompetenter Bakterien gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Danach wird der Transformationsansatz auf selektivem LB-Agar, der auf 37°C vorgewärmt wurde, ausplattiert.

4.2 Isolierung und Aufreinigung von DNA

4.2.1 Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionenaustauscher-Chromatographie („Plasmid-Miniprep“)

Die hier beschriebene Präparationsmethode ist abgeleitet von der Originalvorschrift nach (Birnbom and Doly 1979). Das Prinzip wird im Folgenden erläutert:

Als erstes werden die Zellen durch Detergenzeinwirkung und osmotischen Schock aufgebrochen. Derselbe Puffer enthält NaOH und SDS wodurch es zum einen zu einer reversiblen alkalischen Denaturierung der Nukleinsäuren kommt und einer irreversiblen Denaturierung der Proteine. Anschließend wird der pH-Wert erniedrigt, so daß die Nukleinsäuren wieder renaturieren. Dabei findet eine intermolekulare Renaturierung bei der chromosomalen *E. coli*-DNA statt, wobei sich hochmolekulare, netzartige unlösliche Strukturen bilden, während jedoch die Plasmid-DNA aufgrund der topologischen Verknüpfung ihrer Einzelstränge intramolekular renaturiert und in Lösung bleibt. Zelltrümmer, Membranteile, denaturierten Proteine und chromosomale DNA können durch Zentrifugation von der Plasmid-DNA und RNA abgetrennt werden.

- Von einer 5 ml Übernacht-Kultur werden ca. 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt
- 5 min bei 6000 Upm zentrifugiert.
- Der Überstand wird verworfen, das Bakteriensediment in 100 µl Lösung I aufgenommen
5 min auf Eis inkubiert.
- Danach werden der Suspension 200 µl Lösung II zugegeben und diese für weitere 5 min auf Eis inkubiert.
- Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird die Lösung gut geschüttelt, 10 min bei 15000g zentrifugiert, und der Überstand (ca. 450 µl) in ein neues Reaktionsgefäß überführt.
- Zu diesem Überstand 500 µl Isoprpanol hinzugeben und die Nukleinsäuren 10 min auf Eis fällen.
Sedimentieren der Nukleinsäuren durch 30 minütige Zentrifugation bei 15000 Upm und 4°C.
- Das Nukleinsäuresediment wird anschließend zweimal mit 1000 µl 80 %igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert, 10min, 15000g.
- Absaugen des Überstandes, trocknen der DNA im 'Speed-Vac'-Konzentrator 1 bis 2 min und in 50 µl TE oder H₂O lösen.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA beträgt bei einer 1,5 ml Ausgangskultur bis zu 5 µg, je nach Kopienzahl des Plasmids. Die Qualität der so präparierten DNA ist ausreichend für Restriktionsanalysen und Sequenzierreaktionen. Zur Restriktionsanalyse kann es notwendig sein dem Ansatz RNase zuzusetzen (0,1µg/ml)

4.2.2 Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA über Anionen Austausch Chromatographie ('Maxi-Prep')

Die präparative Aufreinigung superhelikaler Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen erfolgt nach einem modifizierten Protokoll der von Birnboim und Doly (1979) beschriebenen Methode in Kombination mit einer Säulenchromatographie (Birnboim and Doly 1979). Aufgrund ihrer Ladung läßt sich DNA über eine Anionen Austauschermatrix aufreinigen. Zu diesem Zweck werden kommerziell erhältliche Säulen, in dieser Arbeit (JETSTAR Anionenaustauschersäulen der Firma GENOMED), verwendet. Auf diese wird das Bakterienlysat in Gegenwart von 1M NaCl aufgetragen. Die Plasmid-DNA bindet aufgrund ihrer starken negativen Ladung mit hoher Affinität an das Säulenmaterial. Während des anschließenden Waschschrittes kann nur die Plasmid DNA an die Matrix haften, die restlichen zellulären Komponenten lassen sich eluieren. Die Plasmide werden durch die Erhöhung der Salzkonzentration eluiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Qualität der auf diese Weise gewonnenen Plasmid-DNA reicht aus, um sie für Transfektionsexperimente in eukaryontischen Zellen einzusetzen

4.2.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Diese Methode (Boyle and Lew 1995) macht sich die Eigenschaft der dsDNA zu nutze, unter bestimmten Bedingungen (hohe Konzentrationen kaotroper Salze, wie z.B NaJ) reversibel an eine Glasmilchmatrix zu binden, von denen sie später mit Wasser oder Puffer wieder eluiert werden kann. Dafür wird das Agarosegel mit der entsprechenden DNA in Gegenwart Hochsalzbedingungen geschmolzen und adsorbiert anschließend an die Silicamatrix. Nach mehreren Waschschritten kann das gebundene DNA-Fragment unter bestimmten Inkubationsbedingungen, niedrig-Salz Puffer oder Wasser, von der Matrix eluiert werden. Die Reinigung mit Hilfe des „QIAquick-spin Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) ist für DNA-Fragmente einer Größe von mehr als etwa 80 Bp geeignet:

- Durchführung der DNA-Fragmentisolierung:
gewünschte DNA-Bande wird aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausschneiden und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen.
- Zugabe von Gelauf Lösungspuffer (40µl per 100mg Agarose). Gelstück bei 55°C vollständig schmelzen (Dauer: 5 bis 10 min). Ab und zu mischen.
- Ansatz in das Filtergefäß (mit 2 ml Auffanggefäß) überführen.
- 1 minütige Zentrifugation bei 13000g, einmal mit 700 µl Waschpuffer waschen
- Zentrifugation für 60s bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge
- Verwerfen des Durchlaufs

- Nochmaliges Waschen und Zentrifugieren (es ist wichtig, daß alle Ethanolreste entfernt werden)
- 50 µl TE-Puffer oder H₂O auf den Filter geben und nach 5 minütige Inkubation, zentrifugieren bei 13000g für 1 min und den Überstand abnehmen.
- Die qualitative und quantitative Analyse des eluierten DNA-Fragmentes folgt durch Gelelektrophorese eines Aliquots des Eluats.

4.2.4 Reinigung von PCR-Produkten aus Lösungen

In der Gegenwart eines Hoch-Salz Puffers bindet die amplifizierte DNA an die Silicamatrix der kommerziell erhältlichen Säule. Primer, Nukleotide, Polymerase sowie Salze aus dem Ansatz werden entfernt, so daß das PCR-Produkt in reiner Form vorliegt und für weitere Analysen bzw. Manipulationen verwendet werden kann. Das Protokoll bezieht sich auf die Reinigung von PCR-Produkten mit dem „QIAquick-spin PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden). Das nachfolgende Protokoll kann für die Reinigung von PCR-Produkten einer Größe von 100 Bp bis 10 kBp dienen:

- Zu 1 Volumen des PCR-Ansatzes 5 Volumina Puffer PB geben und durch Schütteln mischen
- Ein Filtergefäß („Spin column“) in ein 2 ml Auffanggefäß stellen und mit dem Gemisch aus Schritt 1 beladen
- Zentrifugation für 60s bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge
- Durchlauf verwerfen
- 0,75 ml Puffer PE auf die Säule geben (Waschschritt)
- Zentrifugation für 60s bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge
- Durchlauf verwerfen
- Zentrifugation wiederholen, um Reste an Ethanol in Puffer PE zu entfernen
- Filtergefäß in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß stellen und 50 µl H₂O auf den Filter geben.
- Filtergefäß 1 Minute stehen lassen
- Zentrifugation für 60s bei 13000 Upm in einer Tischzentrifuge
- Der Durchlauf enthält die DNA
- Lagerung bis zur Verwendung bei -20°C

4.2.5 Extraktion von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen (Phenolextraktion)

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen versetzt man diese mit dem gleichen Volumen an äquilibriertem Phenol. Über einen Zeitraum von 2-3 Min. werden beide Phasen durch kräftiges Schütteln gemischt und danach zur Phasentrennung 5 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Die denaturierten Proteine sind häufig als weißer Film in der Interphase zu erkennen. Die Proteine gehen in die phenolische Phase und in die Interphase über. Die wässrige Oberphase, die die DNA enthält, wird bei Bedarf weiteren Phenolextraktionen unterzogen. Zur weiteren Verwendung wird die DNA-Lösung schließlich von Phenolresten befreit. Um die wässrige Phase zu extrahieren wird das gleiche Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol Gemisches (24:1) dazugegeben. Anschließend wird die Nukleinsäure mit Ethanol präzipitiert und das Sediment im gewünschten Volumen 1x TE aufgenommen.

Äquilibration des Phenols:

Phenol muss vor Gebrauch äquilibriert bzw. sein pH-Wert eingestellt werden, zusätzlich wird es durch Zusatz von Antioxidantien haltbar gemacht.

- Phenol bei 65°C schmelzen
- 0,1 g 8-Hydroxyquinolin / 100 ml hinzufügen (Gelbfärbung)
- mit jeweils 1 Volumen 1M Tris/HCl, pH 8,0 so lange ausschütteln bis pH-Wert der wässrigen Oberphase im neutralen Bereich liegt (pH 6,5-7,5).
- mit 1 Volumen 0,1M Tris/HCl, pH 8,0, 0,2% β-Mercaptoethanol äquilibrieren
- erneut äquilibrieren mit 1x Vol. 10mM Tris/HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, 0,2% β-Mercaptoethanol
- wässrige Phase belassen. Lagerung lichtgeschützt bei 4°C.

4.2.6 Konzentrierung von Nukleinsäurelösungen (Ethanol-fällung)

Bei einer Ethanol-fällung wird die Nukleinsäurelösung zunächst mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (NaAc), pH 4,8-5,2 versetzt, bevor das 2,5-fache Volumen an kaltem Ethanol zugegeben wird. Aus dieser nun ca. 70%igen Ethanol-Lösung fallen die Nukleinsäuren als Natriumsalze aus, da die Ethanolmoleküle die Hydrathüllen der Nukleinsäuren verdrängen und somit die DNA dehydrieren. Zur quantitativen Fällung aus Lösungen mit geringerer Nukleinsäurekonzentration (weniger als 10µg/ml) werden diese für 20 Minuten bei -80 °C gelagert. Nach dem Abzentrifugieren der Nukleinsäuren (Tischzentrifuge, 10 min, 13000Upm, 4 °C) wird das Präzipitat mit 80%igem Ethanol gewaschen. Zum Trocknen wird die DNA entweder für 1-2 Minuten in die Speed-Vac-Konzentrator gegeben oder Luft-getrocknet.

4.3 Analyse von DNA

4.3.1 Photometrische Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäurelösungen

Gemäß dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung direkt proportional zu ihrer Extinktion bzw. Absorption. Diese Relation macht man sich bei der spektralphotometrischen Quantifizierung von wässrigen Nukleinsäurelösungen zu Nutze.

Von einer Verdünnung der gereinigten Nukleinsäure wird im Spektralphotometer die Absorption bei 260nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und bei 280nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Die Messung erfolgt in 500 µl Quarz-Küvetten. Es gilt folgende Beziehung zwischen gemessener Absorption und Konzentration der Nukleinsäure:

$$\begin{aligned} 1 \text{ OD}_{260} &= 50 \text{ µg/ml für dsDNA} \\ 1 \text{ OD}_{260} &= 40 \text{ µg/ml für ssDNA} \\ 1 \text{ OD}_{260} &= 30 \text{ µg/ml für ssOligonukleotide:} \end{aligned}$$

Die Berechnung der Konzentration von dsDNA erfolgt dementsprechend nach der Formel:

$$\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times 0,05 \text{ mg/ml} = \text{dsDNA-Konzentration (mg/ml)}$$

Ein Maß für die Verunreinigung mit Protein liefert das Verhältnis $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$. Dieses sollte für proteinfreie Nukleinsäurelösungen 1,7-1,9 betragen.

4.3.2 Fragmentierung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionendonukleasen fragmentieren sequenzspezifisch dsDNA. Die Enzyme werden verwendet um Plasmide zu analysieren und für die präparative Generierung von DNA-Fragmente, die in vitro zu neuen Plasmiden rekombiniert werden können.

Man unterscheidet drei Typen von Restriktionsendonukleasen (TypI-III), für die Forschung ist Typ II am wichtigsten. Diese Enzyme erkennen Tetra-, Penta-, Hexa- oder Oktanukleotidsequenzen mit Rotationssymmetrie. Die Hydrolyse beider Stränge erfolgt dabei in der Erkennungssequenz, wobei einzelsträngige 5'-bzw. 3'-Überhänge oder auch doppelsträngige, glatte Enden (blunt-ends) entstehen. Die 5'-Enden sind phosphoryliert, die 3'-Enden immer hydroxyliert. Jedes Restriktionsenzym benötigt individuelle Reaktionsbedingungen zur Hydrolyse. Die wichtigsten Parameter sind die Inkubationstemperatur und die Zusammensetzung des Reaktionspuffers. Stellen verschiedene Restriktionsendonukleasen die gleichen Anforderungen an eine Reaktion, kann man sie gemeinsam in einem DNA-Restriktionsenzym-Verdau einsetzen. Ansonsten, erfolgt die Restriktion sequenziell. Nach jedem Restriktionsverdau muß die DNA erst gefällt werden, um dann im Reaktionsmilieu des anderen Enzyms geschnitten zu werden. Analytisch werden 0,5-1µg Plasmid-DNA fragmentiert.

Die Menge an einzusetzenden Enzymen pro Ansatz wird aus den Aktivitätsangaben (units/µl) des Herstellers errechnet. Eine unit ist definiert als die Menge an Enzym, die notwendig ist, um 1 µg l-DNA (50000bp) vollständig in einer Stunde zu spalten. Das Ansatzvolumen ist abhängig von der Menge der zu verwendenden Restriktionsenzymen. Käufliche Enzym-Präparationen enthalten oft bis zu 50% Glycerin. Die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz sollte 5 % nie übersteigen, da Restriktionsenzyme allgemein bei zunehmenden Glycerinkonzentrationen 'Star-Aktivität' zeigen (Polisky *et al.*, 1975). Die Inkubationszeit für eine Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA beträgt im allgemeinen 1-2 h. Längere Inkubationszeiten sind jedoch möglich. Insbesondere bei Verdau von DNA-endständigen Restriktionsschnittstellen z.B. bei PCR-Produkten, können längere Inkubationszeiten nötig sein. Bei Fragmentierung von 'Mini-Prep'-DNA muß infolge des hohen Anteils an RNA dem Ansatz zusätzlich RNase A (50 µg/ml Endkonzentration) zugegeben werden, um diese zu degradieren. Hitzelabile Restriktionsenzyme werden durch Erhitzen auf 65°C für 5 Min. inaktiviert, während hitzestabile Restriktionsenzyme durch Phenol / Chloroform extrahiert werden.

4.4 In vitro Modifikation von DNA

4.4.1 Auffüllen von 5'-überhängenden, bzw. entfernen von 3'-überhängenden DNA-Enden durch T4 DNA-Polymerase

Für die Ligierung von DNA-Fragmenten mit nicht-kompatiblen Enden ist es notwendig, doppelsträngige und glatte Enden („Blunt-ends“) zu erzeugen. Dazu wurde in dieser Arbeit das Enzym DNA-Polymerase des Bakteriophagen T4 verwendet. Es katalysiert zwei verschiedene Reaktionen: Bei Anwesenheit von

Desoxyribonukleinsäuren (dXTP) katalysiert es die Polymerisation an verkürzten Hydroxylenden der DNA-Fragmente. Dadurch werden 5'-einzelsträngige Enden aufgefüllt. In Abwesenheit von Desoxyribonukleinsäuren besitzt die Polymerase Exonukleaseaktivität und entfernt die 3'-überhängende Enden. Die Reaktion findet in einem Volumen von 20-50 µl 1 * T4-Reaktionspuffer für 30 Min, bei 37 °C statt. Zur Auffüllreaktion werden dem Ansatz 0,1 pmol dNTPs zugeben. Die Reaktion wird durch Ethanolpräzipitation gestoppt.

4.4.2 Dephosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase

Es ist bei einem Ligationsansatz manchmal nützlich unerwünschte Ligations-Nebenreaktionen, z.B. Religationen geschnittener „Vektor“-DNA-Fragmente, zu unterbinden. Dazu werden die 5'-Phosphat-Enden der DNA entfernt und somit 5'-hydroxylierte Enden erzeugt. Es wird 1-10 pmol der DNA bei 37 °C für 15-30 Min. in 20-50 µl einfach konzentriertem Reaktionspuffer mit 1 Unit alkalischer Phosphatase (CIP für „calf-intestine-phosphatase“) inkubiert. Bevor die Fragmente für Ligierungen eingesetzt werden muß das Enzym über eine Phenol-Chloroform-Extraktion vollständig entfernt werden.

4.4.3 Kovalentes Verknüpfen von DNA-Fragmenten durch T4 DNA-Ligase

Das Enzyme DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryltermini doppelsträngiger DNA. Benötigte Ko-Faktoren des Enzyms sind Mg^{2+} -Ionen und ATP. Eine Einheit (auch Weiss-Einheit genannt) ist definiert als die Enzymmenge, die eine Konversion von 1 nmol $^{32}P_i$ in ATP bei 37°C in 20 min katalysiert.

Die Menge an Ligase im jeweiligen Reaktionsansatz hängt von mehreren Faktoren ab, z. B. der Natur der zu ligierenden DNA-Fragmente ("blunt"-Enden oder Enden mit 3'- oder 5'-Überhängen), der Stabilität der Wasserstoffbrücken-Struktur, der Inkubationstemperatur und der Konzentration von DNA-Fragmenten. Standardligationen von DNA-Fragmenten mit kohäsiven Enden bestehen aus 0,02 pmol Vektor-DNA, einem 3 bis 5 fachen molaren Überschuß an dem DNA-Fragment, welches in den Vektor eingesetzt werden soll, und 1 u T4-DNA-Ligase, gelöst in Ligasepuffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl. Nach einer Inkubation ü.N. bei 16°C wird die Reaktion durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt. Für $CaCl_2$ -Transformationen kann die DNA direkt aus dem Ligationsansatz eingesetzt werden.

4.4.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann selektiv eine DNA-Sequenz *in vitro* amplifiziert werden (Saiki et al. 1988). Die Synthese wird an zwei DNA-Oligonukleotiden, Primern, gestartet, die so gewählt sind, daß sie den zu amplifizierenden Bereich flankieren. Eines der beiden Oligonukleotide bindet dabei im Plus-Strang, das andere im Minus-Strang der zu vervielfältigenden DNA. Die PCR wird in einem sog. Thermocycler durchgeführt und besteht prinzipiell aus drei Schritten, deren einzelne Parameter für auf die jeweiligen Primer und die Länge der Matrize individuell optimiert werden müssen.

Zuerst wird die DNA über Erhitzung in ihre Einzelstränge denaturiert : bei über 95°C für 30 Sek. bis 1 Min. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf 45-65°C können die Primer sequenzspezifisch an die DNA-Matrize hybridisieren. Schließlich, erfolgt beim Temperaturoptimum der thermostabilen DNA-Polymerase (72-74°C) die DNA-Neusynthese ausgehend von den 3'-OH-Enden der beiden hybridisierten Oligonukleotiden. Dieser Zyklus wird je nach den Erfordernissen 28 – 35-mal wiederholt, wodurch eine exponentielle Amplifikation der DNA stattfindet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für die Klonierung von DNA-Sequenzen und auch zur Verifizierung von Klonen benutzt. Primer, die für Klonierungen verwendet wurden, besaßen zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsenzyme, wodurch sich amplifizierte DNA-Fragmente mit definierten Enden erzeugen ließen.

Für die meisten Amplifikationen von Plasmid-DNA wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

Reaktionsvolumen	50 µl
Plasmid DNA-Matrize	0,05 pmol
„Primer“	je 25 pmol
Pwo-Polymerase	2,5 U
Nukleotide (dNTP's)	je 200 µM
Puffer	50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,3
MgCl ₂	1,5 mM

Nach einer initialen Denaturierung von 2 min bei 95°C verläuft die PCR im weiteren nach folgendem Zyklus (25 - 30x):

Denaturieren der DNA	30 sec, 95°C
Hybridisieren der „Primer“	1 min, 52-62°C
Elongation	1 min, 72°C

Nach 25 Zyklen wird die Reaktion durch eine 5-7 min Inkubation bei 72°C abgeschlossen und anschließend ein Aliquot der Reaktion (5-10µl) elektrophoretisch in einem kleinen Agarose-Gel (0,8 - 1%) analysiert.

4.4.5 Einführung ortsspezifischer Nukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden längere Nukleotidsequenzen in Plasmide eingeführt mit dem Ziel neue Restriktionsschnittstellen für Klonierungen zu erhalten und z.B. lox P Sequenzen einzuführen. Die in vitro Mutagenese wird jedoch vor allem für den Austausch einzelner oder weniger Nukleotide genutzt. Für beide Anwendungen werden zwei Primer konstruiert die zueinander komplementäre Sequenzen enthalten.

i) Für die Einführung von längeren Sequenzen in Plasmide :

Die beiden komplementären Primer hatten endständige Restriktionsschnittstellen. Je 10µl (10pmol/µl) der Primer wurden in einem Reaktionsgefäß gemischt. Anschließend wurde der Ansatz auf 95° C erhitzt und die Temperatur sehr langsam gedrosselt um das korrekte Hybridisieren der beiden Oligonukleotide zu unterstützen. Die nun doppelsträngige DNA konnte in einem Ligationsansatz verwendet werden.

ii) Bei dem Entwurf von Mutageneseoligonukleotide sind folgende Regeln unbedingt zu beachten:

Die Länge der spezifischen Oligonukleotide soll zwischen 25 und 45 Bp liegen.

Die Schmelztemperatur (T_m) der Oligonukleotide muss mindestens 78°C erreichen und wird nach folgender Formel berechnet: $T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - 675/N - \%mismatch$ (N steht für die Länge des Oligonukleotides in Bp).

Die Mutation, Deletion oder Insertion soll in der Mitte des Oligonukleotides liegen und auf jeder Seite von einer Sequenz von 10 – 15 Bp flankiert sein, die zur Matrize-DNA zu 100 % komplementär ist.

Der GC Gehalt des Oligonukleotides sollte mindestens 40% betragen.

Die Matrizen-DNA wird ausgehend von den mutagenisierenden Oligonukleotiden während der Amplifikation mit der Pwo-DNA-Polymerase vermehrt. Durch diese PCR entstehen neue DNA-Moleküle, die im Unterschied zu der Matrizen-DNA semi-methyliert bzw. unmethyliert sind. Der Verdau mit der Restriktionsendonuklease Dpn I (Erkennungssequenz: 5'-Gm6ATC-3'), die spezifisch nur methylierte und semimethylierte DNA-Sequenzen schneidet, führt anschließend zum Verdau der aus E.coli stammenden Matrizen-DNA, wodurch nur die neu durch die DNA-Oligonukleotide synthetisierten mutierten DNA-Moleküle übrig bleiben, die durch eine Transformation in E. coli klonal vermehrt werden können

Die PCR wird in folgender Zusammensetzung vorbereitet:

Pwo-DNA-Polymerasepuffer (10x)	5 µl
DNA-Plasmid	10-100 ng
DNA-Oligonukleotide	500 nM
dNTPs	200 µM
Pwo-DNA-Polymerase	2,5U
ddH ₂ O	ad 50µl

Die Anzahl der Zyklen sowie die Polymerisationszeit sind abhängig vom Typ der einzuführenden Mutation bzw. von der Länge des zu amplifizierenden Plasmids. Es gilt:

Punktmutation	12 Zyklen
Einfacher Aminosäureaustausch	16 Zyklen
Mehrfache Aminosäuredeletion/Insertion	18 Zyklen

Der initialen thermischen Denaturierung der DNA (95 °C, 30 sec) folgen:

12-18 Zyklen	95°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	2 min/kb des zu amplifizierenden Plasmids

Die Reaktion wird durch Abkühlung des Ansatzes beendet, indem das Reaktionsgefäß für etwa 2 min auf Eis gekühlt wird. Dem abgekühlten Reaktionsansatz werden 10U Restriktionsenzym Dpn I zugegeben und mittels vorsichtigen Ab- und Aufpipettieren gemischt. Die folgende einstündige Inkubation bei 37°C ermöglicht den Restriktionsverdau des parentalen, nicht mutierten DNA Stranges. 1 µl des Reaktionsansatzes ist ausreichend für

die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen mit der zu erwartenden Anzahl von 50 bis 800 Kolonien. Laut Angaben des Herstellers beträgt die Effizienz 80%.

4.5 Herstellung und Renaturierung rekombinanter MSP-1 Fragmente

4.5.1 Expression von *msp-1* Fragmenten in *E. coli*

Msp-1 und verschiedene *msp-1* Fragmente wurden in *E. coli* Bakterien nach dem folgenden Protokoll exprimiert. In dieser Arbeit wurden Expressionen sowohl im analytischen Maßstab mit einem Kulturvolumen von 5ml (im Reagenzglas) als auch zur Herstellung größerer Proteinmengen mit einem Volumen von bis zu 1 Liter (im 5 L-Schüttelkolben) durchgeführt.

- Transformation von *E. coli* Bakterien mit *msp-1* tragenden Expressionsvektoren
- Animpfen von Kulturen ausgehend von einzelnen Klonen
- Aufwachsen der Kultur bei 37°C unter starkem Schütteln
- Induktion in der frühen log-Phase ($OD_{600} = 0,3 - 0,5$) mit 1 mM IPTG
- Inkubation für weitere 3-4 h bei 25°C oder 37°C (je nach Protein) unter starkem Schütteln
- Sedimentation der Bakterienkultur durch Zentrifugation (10 min bei 6000 g)
- Lagerung bei -20°C

Zur elektrophoretischen Analyse der Expression wird ein Aliquot von 1,5 ml Bakterienkultur entnommen:

- Sedimentation der Bakterien durch Zentrifugation (10 min bei 6000 g)
- Aufnahme des Sediments in 200 µl Protein-Probenauftragspuffer
- Probe 5 min aufkochen
- 5 – 10 µl über SDS-PAGE analysieren

4.5.2 Aufschluss der Bakterienzellen

Nach Zentrifugation der Bakterienkultur für 10 – 15 min bei 6000 g, wird das Bakteriensediment in 1-2 ml Lysepuffer pro Gramm Bakterienfeuchtmasse aufgenommen und für 20 - 30 min auf Eis inkubiert.

Der Zellaufschluss erfolgt durch zwei Durchgänge in der „French press“ bei 1000 p.s.i. Nach Zentrifugation des Bakterienlysats bei 40.000 g für 40 min findet man die löslichen Komponenten des Zellextrakts im Überstand, der entweder innerhalb weniger Stunden für eine chromatographische Reinigung verwendet (Lagerung bei 4 °C) oder bei -80°C eingefroren wird.

4.5.3 Solubilisierung der Einschlusskörperchen

Das Sediment, das auch die Einschlusskörperchen enthält, wird mit Hilfe eines Ultraturax Homogenisators in Solubilisierungspuffer (gleiches Volumen wie Lysepuffer) aufgenommen und für 2 – 3 h bei RT auf dem Drehrad gemischt. Nachdem durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 40.000 g für 30 min die solubilisierten „inclusion bodies“ von den komplett unlöslichen Bestandteilen getrennt wurden, wird der Überstand gegen mindestens 100 Volumen 6 M GdmCl, pH 3 dialysiert. Der Dialyseschritt ist notwendig, um das DTT im Solubilisierungspuffer, das bei der Renaturierung unerwünscht ist, zu entfernen. Der niedrige pH-Wert bewirkt die Protonierung der Sulfhydryl-gruppen, was eine Oxidation der Cysteinseitenketten und die Ausbildung von Disulfidbindungen verhindert. Die Proteinkonzentration der Einschlusskörperchen wird mit der Biuret-Methode (4.6.7) bestimmt. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

4.5.4 *In-vitro*-Rückfaltung der Einschlusskörperchen mittels Pulsrenaturierung (Rudolph and Lilie 1996)

Zur Rückfaltung der in *E. coli* zunächst in unlöslichen Einschlusskörperchen („inclusion bodies“, IBs) vorhandenen MSP-1 Fragmente, wurde ein als Puls-Renaturierung bezeichnetes Verfahren angewandt (Rudolph and Lilie 1996):

Die solubilisierten „inclusion bodies“, deren Konzentration 20 –30 mg/ml betragen sollte, werden in einem Renaturierungspuffer, auf eine Endkonzentration von 0,15 mg/ml verdünnt und durch leichtes Umrühren gemischt. Dieser Vorgang wird in Abständen von mindestens einer Stunde bis zu acht mal wiederholt, so daß im Renaturierungspuffer eine Endkonzentration von 1 – 1,2 mg / ml erreicht wird. Nach zweimaliger Dialyse gegen 50 Volumen eines für die anschließende Chromatographie geeigneten Puffers (z. B.: 50 mM Tris, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin) werden eventuell entstandene Proteinpräzipitate durch Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min sedimentiert. Der Vorgang der Renaturierung findet bei 4 - 10 °C statt, die Dialyse und anschließende Zentrifugation bei 4°C. Die renaturierte Proteinlösung sollte bei -80°C gelagert werden.

4.6 Chromatographische Reinigung der rekombinanten MSP-1 Fragmente

In dieser Arbeit wurden die Flüssigchromatographien mit den Chromatographiesystemen „Äkta Purifier 10“ oder „Äkta Basic“ der Firma Amersham Bioscience durchgeführt. Die Chromatographiesysteme messen während der Chromatographie Parameter wie pH-Wert und Leitfähigkeit, die Rückschlüsse auf die Pufferbedingungen auf der Säule zulassen. Außerdem wird durch Messung der Absorption von Licht der Wellenlänge 280 nm die von der Säule eluierte Proteinkonzentration verfolgt. Dies erlaubt es, einen Arbeitsschritt solange durchzuführen, bis die gewünschten Pufferbedingungen eingestellt bzw. ein Wasch- oder Elutionsvorgang abgeschlossen ist. Deshalb wird in den folgenden Aufreinigungsprotokollen weitgehend auf Angabe der Puffervolumen eines Arbeitsschrittes verzichtet. Falls nicht anders angegeben, fanden die Chromatographien sowie die Probenvorbereitung bei 4°C statt.

Beschreibung des Aufreinigungsprozesses für pHX38F:

- IBs wurden präpariert und in dem beschriebenen Solubilisierungspuffer gelöst.
- Pulsrenaturierung in den Renaturierungspuffer (1M Arginin, 100mM Tris/HCl, 2mM DTT, 2 mM EDTA): In 10 Schritten wurden jeweils 100µg/ml IB-Lösung in ein Volumen von 10ml Renat.puffer gegeben, so daß eine Endkonzentration von 1mg/ml Protein bestand. Zwischen jedem Puls wurde 1 h bei 4 °C inkubiert.
- Der Renaturierungsansatz wurde nun ü.N. 4 °C umdialysiert (PBS, 2mMEDTA, 2mM DTT, pH 7.4).
- Ni-Affinitätschromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen (s. Imidazol unten): Gewaschen wurde zweimal mit Puffer B (50mM NaHPO₄, 200 mM NaCl) der jeweils 10 mM Imidazol bzw. 50 mM Imidazol enthielt. Die Elution des Proteins fand über den Auftrag von Puffer B, 250 mM Imidazol statt.

Beschreibung des Aufreinigungsprozesses für p42F:

Bis auf die im Folgenden beschriebenen Punkte fand der Reinigungsprozess wie für pHX38F statt.

Renaturierung fand in Renaturierungspuffer mit Redoxsystem statt (1M Arginin, 100mM Tris/HCl, 2mM DTT, 2 mM EDTA, 1mM Gluthation reduziert, 0,1mM Gluthation oxidiert).

- Der Renaturierungsansatz wurde umdialysiert in 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 7,7
- Aufreinigung mittels Ni-Chelat-Affinitätschromatographie.
- Anschließende Aufreinigung über Immunaффinitätschromatographie (Ak:5.2).

4.6.1 Ni²⁺-Chelat-Chromatographie

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der spezifischen Affinität von Oligo-Histidinen an Ni²⁺-Metallionen lassen sich über Bildung eines Chelatkomplexes z.B. an einer Nitrilo-Tri-Essigsäure (NTA) Sepharose immobilisieren. Fusionsproteine mit 6 Histidinresten binden an diese Gelmatrix und lassen sich so aufreinigen (Hochuli 1988). Die Chromatographie kann unter denaturierenden und unter nicht-denaturierenden Pufferbedingungen durchgeführt werden.

Ni²⁺-Chelat-Chromatographie unter nicht-denaturierenden Bedingungen:

- Äquilibrieren der Säule wird mit mehreren Säulenvolumen Puffer A Flussrate (1 ml/min)
- Zentrifugation der Probe (z.B. renaturierte Einschlusskörperchen von pHX38F) für 10 min bei 10.000 g, um unlösliche Bestandteile abzutrennen
- Probenauftrag mit 0,5 ml/min
- Waschen mit Puffer A
- Waschen mit Puffer B, 10 mM Imidazol, 2 Säulenvolumen
- Waschen mit 20 mM Imidazol (gemischt aus Puffer A+ B)
- Waschen mit 50 mM Imidazol (gemischt aus Puffer A+ B)
- Elution der Hexahisproteine mit 250 mM Imidazol (gemischt aus Puffer A+ B)
- Entfernen der verbleibenden Proteine mit 500 mM Imidazol (Puffer B)
- Äquilibrieren mit Puffer A

Die Chromatographie unter denaturierenden Bedingungen wird bis auf folgende Änderungen entsprechend dem obigen Protokoll durchgeführt:

Die Probe (z.B. solubilisierter Einschlusskörperchen von p30F) wird gegen 100 Volumen 50 mM NaH₂PO₄, pH8, 6 M Harnstoff dialysiert.

Regeneration der Chromatographiematrix:

Die komplexierten Metallionen werden durch Waschen mit 2 Säulenvolumen 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 entfernt. Nach Waschen mit 4 Säulenvolumen Wasser, wird die Matrix mit 0,5 Säulenvolumen 100 mM NiSO₄ neu beladen. Zur kurzzeitigen Lagerung (< 1 Woche) bei 4°C kann die Säule mit 2-3 Säulenvolumen PBS äquilibriert werden. Die dauerhafte Lagerung erfolgt in 20% Ethanol.

4.6.2 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltrationschromatographie werden Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Matrix besteht aus löchrigen Kügelchen mit definierter Porengröße. Moleküle die klein genug sind, um in die Poren einzudringen, stehen ein größeres Säulenvolumen zur Verfügung als größeren Moleküle, die sich nur im „Ausschlussvolumen“ außerhalb der Matrixkügelchen bewegen. Kleine Moleküle brauchen folglich länger, um durch die Matrix einer Gelfiltrationssäule zu wandern. Der Bereich der Auftrennung wird bestimmt durch die Porengröße und Beschaffenheit der Matrix. In dieser Arbeit wurden zwei Matrices, Superdex 200 und Superdex 75 der Firma Amersham Bioscience verwendet.

Die Säule wird mit 50 mM NaCl, 1mM EDTA, 20 mM Tris, pH 8 äquilibriert. Vor dem Probenauftrag wird die Proteinlösung für 10 min bei 10,000g abzentrifugiert, um Präzipitate zu entfernen. Nach Auftragen des Überstandes Flussrate (1 ml/min) wird die Chromatographie durch Zugabe von Äquilibrierpuffer mit Flußraten von 1,0-1,5 ml/min (Superdex 75) durchgeführt.

4.6.3 Immunaффinitätschromatographie

Bei diesem Typ der Affinitätschromatographie wird das aufzureinigende Protein hochspezifisch und reversibel von seinem Liganden, einem monoklonalen Antikörper, adsorbiert, der mit einer nichtlöslichen Matrix (Protein A-Sepharose) kovalent verbunden ist.

Vorbereitung der Immunaффinitätsmatrix mit mAk 5.2

Für ein Säulenvolumen von 1 ml werden 1,5 ml Sepharose-Protein A-Suspension zweimal mit NET-Puffer, pH7,4 gewaschen. Dabei wird das Chromatographiematerial in der Tischzentrifuge für 10 Sekunden bei 4000rpm sedimentiert und in 500 µl Puffer aufgenommen, bevor es für mindestens 1 h unter ständigem Schütteln mit 50 ml Hybridomüberstand inkubiert wird. Die Sepharose-Matrix mit den gebundenen Antikörpern wird für 5 min bei 1000 Upm in der Zellkultur-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wird bei 4°C aufbewahrt und kann mehrmals verwendet werden. Nach zweimaligem Waschen mit je 15 ml wird das Sediment in 15 ml Borax-Puffer aufgenommen. Die kovalente Verknüpfung von Protein-A mit den Antikörpern erfolgt durch 30 minütige Inkubation in 20 mM DMP, das als Pulver zugegeben wird, unter ständigem Schütteln. Das Material wird für 5 min bei 1000 Upm sedimentiert. Es empfiehlt sich, vor und nach der Kopplung, Aliquots zu je 150 µl (entspricht 10 µl Säulenmaterial) zu entnehmen, um die Kopplung durch SDS-PAGE überprüfen zu können. Nach einmaligem Waschen wird die beladene Sepharose in 15 ml 0,2 M Ethanolamin, pH 8,0 aufgenommen und für 2 h inkubiert. Nach Sedimentation bei 1000 Upm und einmaligem Waschen wird das Säulenmaterial in 10–15 ml TNET aufgenommen und in die Säule überführt. Die Säule wird bei 4°C aufbewahrt. Zur Konservierung kann 0,01% Natriumazid zugegeben werden.

Aufreinigung von rekombinanten MSP-1 Fragmenten mittels Immunaффinitätschromatographie

Die Immunaффinitätsmatrix mit mAk 5.2 wird mit mindestens 5 Bettvolumen NET-Puffer äquilibriert. Anschließend trägt man die Probe bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf die Säule auf. Unspezifisch gebundene Proteine werden mit 5 Säulenvolumen NET-Puffer, gefolgt von 5 Säulenvolumen NET+NaCl-Puffer und 2 Säulenvolumen NET, pH 6,8 ausgewaschen. Die Elution erfolgt durch 0,1 M Glycin-Lösung, pH 2,5. Die Fraktionen werden sofort durch Sammeln in vorgelegten 0,2 Volumen 1M Tris, pH 8,0 neutralisiert und bei –80°C eingefroren.

4.6.4 Analyse von Proteinen durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE wird das Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und N, N'-Methylbisacrylamid hergestellt. Als Stabilisator für freie Radikale dient Tetramethylethyldiamin (TEMED). Proteine besitzen aufgrund ihrer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung kein konstantes Ladungs-Masse Verhältnis. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist eine Detergenz, das sehr fest an Proteine bindet und mit seinen Ionen, die Eigenladung der Proteine maskieren kann. SDS beladene Proteine haben nahezu identische Ladungs-Masse Verhältnisse. In der Elektrophorese trennt man Proteine in der Reihenfolge ihrer molaren Massen auf. Die molare Masse eines Proteins wird anhand von Marker-Proteinen bekannter Masse bestimmt. Um eine scharfe Proteinbanden zu erhalten, läßt man die Proteine in einem zweistufigen PAA-Gel laufen. Dabei durchwandern die Proteine zuerst das großporige Sammelgel (3 %, pH 6,8) und dann das engporige Trenngel (8-

12,5 %, pH 8,8). Der Fokussierungseffekt wird durch das pH-unabhängige Laufverhalten des „Leitons“ Cl⁻ gegenüber dem pH-abhängigen Laufverhalten des „Folgeions“ Glycin bewirkt (Laemmli 1970).

Die im Probenpuffer aufgenommenen Proben werden vor dem Auftrag für 5 min gekocht. Um die kovalenten Disulfidbrücken in den Proteinen zu lösen wurde in dieser Arbeit gelegentlich das reduzierende Reagenz DTT (50mM) in den Probenpuffer gegeben. Im Sammelgel wird eine Spannung von 8 V/cm und im Trenngel von 20 V/cm angelegt.

4.6.5 Färbung von Proteinen in PAA-Gelen

Färbung mit Coomassie-Blau

Die Nachweisgrenze für Proteine liegt bei dieser Methode bei 100-200 ng Protein pro Bande.

Zum Nachweis der Proteine wird das Trenngel 20-60 min bei RT in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Danach wird es mit Wasser abgespült und in Entfärberlösung gelegt. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärberlösung wird das Gel nun 1-12 h bei RT entfärbt.

Anschließend das Gel 1 h in Wasser waschen. Alternativ lassen sich Proteingele auch durch Aufkochen in Wasser (200 ml je Gel, 3 min. in der Mikrowelle) entfärben.

Silberfärbung von PAA-Gelen nach Heukeshoeven

Mit der Silberfärbung können 1 bis 10 ng Protein pro Bande sichtbar gemacht werden.

- Das Gel wird 1 h (oder ÜN) in Fixierlösung 1 geschwenkt.
- Das Gel 30 min mit Fixierlösung 2 behandeln
- Viermal je 15 min mit H₂O waschen.
- Es folgt eine 60 min Inkubation in der Färbelösung.
Reste der Färbelösung werden durch kurzes Schwenken in H₂O und in Entwicklerlösung (je 20 sec) entfernt.
- Das Gel wird nun solange in der Entwicklerlösung geschwenkt, bis die Banden ausreichend geschwärzt sind. Dies kann je nach aufgetragener Proteinmenge 20 sec bis 10 min dauern.
- Die Reaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit Stopplösung beendet.

4.6.6 Western-Blot

Diese Methode wird eingesetzt, um Proteingemische zunächst auf zu trennen und dann ein bestimmtes Protein nachzuweisen. Im ersten Schritt findet die Trennung der Proteine über SDS-PAGE statt. Anschließend erfolgt der Elektrotransfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid, Immobilon-P, Millipore) statt. Dafür wird eine spezielle Blot-Apparatur verwendet, in der die negativ geladenen Proteine Richtung Anode wandern und dabei auf eine mit Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dort werden die Proteine über hydrophobe und z.T. auch elektrostatische Wechselwirkungen festgehalten.

- PVDF-Membran für 1 min in Methanol anfeuchten.
- PVDF-Membran und Chromatographiepapier für 5 min in Transferpuffer schwenken
- Membran, PAA-Gel und 3MM Chromatographiepapier wie folgt anordnen (Hierbei ist darauf zu achten, daß die einzelnen Komponenten luftblasenfrei aneinander anschließen):

-Kathode-
Schaumstoff
2 Lagen 3MM Chromatographiepapier
PAA-Trenngel
Nitrozellulose-Membran
2 Lagen 3MM Chromatographiepapier
Schaumstoff
+ Anode +

Elektrotransfer bei 300 mA und 4°C für 1 – 5 h (je nach Masse des zu testenden Proteins) oder 100 mA ü.N.

Im Anschluß an die Übertragung der Proteine erfolgt eine spezifische Detektion des interessierenden Proteins über Antikörper. Ein spezifischer Primärantikörper bindet das nachzuweisende Protein. Mittels eines AP-konjugierten Zweitantikörpers, der den Fc-Teil des Primärantikörpers erkennt, wird die Primärantikörper-Protein-Bindung sichtbar gemacht. Das Enzym AP setzt zugegebene Substrate zu Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT) und Bromchlorindolylphosphat (BCIP) um, die als blau-violetter Niederschlag auf der Membran erscheinen.

- Schwenken in Absättigungspuffer für 1 h bei RT oder ÜN bei 4°C
- Inkubation mit Primärantikörper (verdünnt im Absättigungspuffer) für 1 h bei RT auf dem Schüttler
- Waschen der PVDF-Membran mit TBST (dreimal für 10 min)
- Inkubation mit dem Sekundärantikörper-Konjugat für 45 min bei RT auf dem Schüttler
- Waschen der PVDF-Membran mit TBST (dreimal für 10 min)
- Zugabe der Entwicklerlösung
- bei ausreichender Färbung der Banden (nach 1-30 min) Abstoppen der Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit Wasser

Trocknen der Membran kann zwischen zwei Stücken 3MM Chromatographiepapier erfolgen.

4.6.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford ist für Proteinlösungen mit einer Konzentration von 0,1-1,5 mg/ml geeignet. Basische Aminosäure-Seitenketten von Proteinen bilden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 Komplexe, die in Lösung blau erscheinen. Die Intensität der Färbung ist proportional zu der Menge an Protein im Reaktionsansatz (Bradford 1976). Das Absorptionsmaximum der Komplexe liegt bei 595 nm. Die Proteinkonzentration kann durch Messung der OD₅₉₅ im Vergleich mit einer Eichkurve bestimmt werden. 800 µl in H₂O verdünnte Proteinlösung werden mit 200 µl filtrierte Bradford-Reagenz-Stocklösung zusammen pipetiert und für 5 min inkubiert.

Für den Nullabgleich wird 800 µl H₂O + 200 µl Bradfordlösung verwendet. Messung der OD₅₉₅ erfolgt am Spektralphotometer. Die Konzentration wird durch den Vergleich mit der Eichkurve ermittelt, die aus Verdünnungen eines Proteinstandards (BSA) erstellt wurde.

Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach der Biuret-Methode

Die Konzentrationsbestimmung mit der Biuret-Methode ist für Proteinlösungen mit Konzentration von mindestens 2 mg/ml geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode für die Bestimmung der Proteinkonzentration von IB-Präparationen genutzt:

- Fällung der Proteine: 50 µl IB-Lösung + 450 µl H₂O + 500 µl TCA
- Abzentrifugieren der gefällten Proteine für 10 min bei 4 °C, 14 000U_{pm}.
- Aufnahme des Sediments in 2 ml Biuret-Reagenz.
- Lösen des Sediments bei 50 °C im Schüttler. Immer mal wieder vortexen um die Auflösung des Sediments zu unterstützen.
- Die Messung erfolgt bei OD₅₄₆ im Photometer und wird nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Konz. (mg/ml)} = (\text{OD}_{546} * 19 * 2) / (\text{Probenvol. (ml)} * 5)$$

Anreicherung von Proteinlösungen

Diese Methode wurde in dieser Arbeit vor allem bei der Tetramerherstellung nach der Gelfiltrationschromatographie verwendet um die biotinylierten Komplexe anzureichern. Mit den „Microsep“-Ultrafiltrationsröhrchen (PALL) kann man Proteinlösungen um einen Faktor von 10-50 ankonzentrieren. Hier, wurden „Mikrosep 10K“ mit einem Ausschlußvolumen von 10kDa verwendet.

Man gibt bis zu 3 ml der zu konzentrierenden Lösung in das Zentrifugationsröhrchen und zentrifugiert bei 3000 g und 4 °C (hier verwendet: SM24 Rotor, äußere Reihe 6000U_{pm}) bis die gewünschte Konzentration erreicht ist (30 min bis einige Stunden).

4.7 Kultivierung von Säugerzellen

4.7.1 Wachstum von Zellkulturen

In dieser Arbeit wurden HeLa A2-Db Zellen verwendet und die beschriebenen Methoden beziehen sich auf diese Zelllinie. Als Kulturmedium wurde für die HeLa-Zelllinien komplettes RPMI 1640-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) verwendet.

Alle Tätigkeiten, die sich mit der Kultivierung von Zellen befassen, erfordern absolute Sterilität der verwendeten Materialien, Lösungen und Medien. Die Arbeiten wurden ausschließlich in sterilen Werkbänken (laminar flow hood) durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in befeuchteten Brutschränken mit einer 5%-igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C.

4.7.2 Passagieren der Zellen

HeLa-Zellen

Die HeLa A2-Db Zelllinie kann sowohl adhären als auch in Suspension wachsen. In unserem Labor wurden sie adhären, als einschichtiger Zellrasen auf dem Boden der Kulturschalen gewachsen. Um Zellen verdünnt auszusäen, oder sie auf mehrere Platten zu verteilen, müssen sie vom Boden der Kulturschale abgelöst werden. Die Zellen haften sich durch Adhäsionsproteine an ihrer Unterlage fest. Diese Interaktion ist, zumindest teilweise, von Kalzium- und Magnesium-Ionen abhängig und kann somit durch EDTA-Zugabe aufgehoben werden. Die Behandlung mit einer PBS(EDTA)-Lösung ist eine schonende Variante, Zellen von ihrem Untergrund abzulösen. Die Methode ist im Folgenden kurz erläutert:

- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS.
- Zugabe des halben Volumens der Kulturmedium entsprechenden Menge an PBS(EDTA)-Lösung.
- Inkubation für 5-15 Min., bis sich die Zellen abrunden und sich beginnen von ihrer Unterlage abzulösen.
- Abspülen der Zellen mit einer Pipette und Überführen der Zellsuspension in ein Schraubdeckelröhrchen entsprechender Größe.
- Sedimentation der Zellen (Zellkulturzentrifuge, 1200 UpM, 5 Min. bei RT)
- Absaugen des Überstands und resuspendieren der Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium (oder PBS). Zur Bestimmung der Zelldichte kann ein Aliquot der Suspension in der Neubauer-Kammer (s.unten) ausgezählt werden.
- Aussäen der gewünschten Zellmenge auf entsprechende Kulturgefäße.

Alternativ kann eine Schnellmethode durchgeführt werden:

- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS.
- Zugabe von PBS(EDTA)-Lösung (entsprechend 1/10 Volumen des verwendeten Kulturmediums), Inkubation für 5-15 Min.
- Die Zellen werden direkt in Kulturmedium aufgenommen und können in gewünschter Menge auf andere Gefäße transferiert werden.

HeLa A2-Db Zellen lassen sich kurz nachdem die Zellen in Suspensionkultur gewachsen wurden nur schlecht durch die Komplexbildung von Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen ablösen. Die Interaktion der Adhäsionsproteine mit der Kulturschalenoberfläche ist zu stark. In solchen Fällen kann man durch eine milde Behandlung mit Trypsin die Oberflächenproteine proteolytisch spalten, so daß sie von der Kulturschale entfernt werden können. Als Reagenz wurde hierfür die Trypsin/EDTA-Lösung der Firma Invitrogen benutzt. Die Methode sieht folgende Arbeitsschritte vor:

- Absaugen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS.
- Zugabe von 2ml Trypsin/EDTA-Lösung in eine 14 cm Platte und Inkubation der Zellen bei 37°C für 5 min
- Zugabe von 5 ml Kulturmedium, um die Spaltungsreaktion zu stoppen
- Abspülen der Zellen mit einer Pipette und Überführen der Zellsuspension in ein Schraubdeckelröhrchen entsprechender Größe.
- Sedimentation der Zellen (Zellkulturzentrifuge, 1200 UpM für 5 Min. bei RT)
- Absaugen des Überstands und resuspendieren der Zellen in einem geeigneten Volumen Kulturmedium (oder PBS). Zur Bestimmung der Zelldichte kann ein Aliquot der Suspension in der Neubauer-Kammer ausgezählt werden.
- Aussäen der gewünschten Zellmenge auf entsprechende Kulturgefäße.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Um Zellen langfristig zu lagern, werden sie bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren:

Dazu werde die Zellen vom Kulturgefäß abgelöst, sedimentiert, in 500 µl eiskaltem FCS resuspendiert, und für 5-10 Min. auf Eis gestellt.

- Zugabe von 500 µl eiskaltem RPMI Medium / 20% DMSO.
- Mischen und Überführen der Suspension in ein 1ml-Einfriereröhrchen für Zellen.
- Zunächst erfolgt das Einfrieren bei -80°C, nach 1-2 Tagen werden die Zellen dann in Tanks mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen werden Einfriereröhrchen zunächst im Wasserbad inkubiert, bis das Einfriermedium zu schmelzen beginnt (angetaut), dann durch rasches Mischen mit 500 µl PBS oder Kulturmedium (ohne FCS, um Schaumbildung zu vermeiden) in 10 ml vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Die Suspension wird abzentrifugiert, um das für die Zellen toxische DMSO unverzüglich zu entfernen. Die Zellen werden anschließend in Kultur genommen.

Zählen von Zellen in der Neubauer-Zählkammer

Der optisch plane Boden Zählkammer ist mit einem rechtwinkligen Zählnetz versehen, das aus Linien besteht. Durch Aufbringen eines Deckglases wird über der Bodenfläche ein Raum abgegrenzt (0,1 mm Höhe), in dem die Zellen mikroskopisch ausgezählt werden. Die zum Befestigen des Deckglases vorgesehenen plan geschliffenen Glasflächen der Kammer werden leicht angefeuchtet, und das Deckglas aufgeschoben. Auf beiden Flächen sollten Newton'sche Ringe sichtbar sein. 1-2 Eckquadrate (16 kleine Quadrate/Eckquadrat) werden ausgezählt.

Formel: $\text{Zellzahl} / \text{Anzahl der Eckquadrate} \cdot \text{Verdünnung} = \text{Zellzahl} \cdot 10^4 / \text{ml}$

4.7.3 DNA-Transfer in Säugerzellen

Um die Regulation und Expression von Genen in einer Säugerzelllinie zu untersuchen, ist es oftmals notwendig DNA von außen in die Zelle zu bringen. Dabei kennt man traditionelle chemische Methoden (DEAE-Dextran- oder Kalzium-Phosphat-Koprazipitations-Methode), die Verwendung kationischer Lipide (Liposomen-Transfektions-Methode) und physikalische Methoden (Elektroporation, Mikroinjektion). Eine ideale Methode, um DNA-Moleküle in eine Zelle zu transferieren, sollte folgende Kriterien erfüllen: Hocheffizienter DNA-Transfer, geringe Toxizität, Reproduzierbarkeit und einfache Durchführbarkeit.

Transiente Kalzium-Phosphat-Transfektion von Plasmid-DNA in Säuger-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Kalzium-Phosphat-Transfektion nach der Methode von (Graham and van der Eb 1973) durchgeführt. Die Zellen nehmen Komplexe aus feinen Kristallen aus DNA und Kalzium-Phosphat auf. Einen Einfluß auf die Effizienz der Aufnahme scheinen dabei pH-Wert des Kulturmediums, Partikelgröße der Kristalle und die Länge der Inkubationszeit, sowie der physiologische Zustand der Zellen zu haben.

- Wechsel der Kulturmediums eine Stunde vor Zugabe der DNA-Kalzium-Phosphat Komplexe
- pH durch Inkubation in 6% CO₂ Brutschrank auf pH 7,2 einstellen.
- Die DNA wird zunächst in eine 250 mM CaCl₂-Lösung gegeben. Für in 6-Loch-Schalen durchgeführte Transfektionsexperimente waren dies: 2 µg DNA in 100 µl CaCl₂-Lösung, bei der Verwendung von 10 cm Kulturschalen wurden 10 µg DNA in 500 µl CaCl₂-Lösung eingesetzt.
- Diese Lösung wurde in kleinen Aliquots in das gleiche Volumen 2x HBS-Puffer gespritzt, wodurch die Ausformung kleiner Kalzium-Phosphat-Kristalle beginnt, die DNA mit einschließen. Das Präzipitat soll sich für ca. 30 Min. bei RT formen, danach wird die Suspension vorsichtig gemischt, verteilt in das Kulturmedium getropft, und zwischen 20 und 36 Stunden mit den Zellen inkubiert.
- Die Zellen werden nach Beendigung der Transfektion (2-4 h) mit PBS gewaschen, um das Präzipitat zu entfernen. Bei den hier verwendeten Hela-Zellen ist dies nicht erforderlich.

Transfektion von Plasmid-DNA in Säuger-Zellen mittels Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch einen kurzen direkten Strompuls ein transmembranes, elektrisches Feld in den Zellen induziert. Dieses transmembrane, elektrische Feld ruft lokale Instabilitäten in der Zellmembran hervor, die „Elektroporen“ genannt werden. Während dieser Instabilitätsperiode ist es nun sogar Makromolekülen wie DNA möglich, in die Zelle zu gelangen. Sind die Parameter optimal gewählt, erholen sich die Zellen nach dem elektrischen Puls wieder und können weiter in Kultur gehalten werden.

- Die Durchführung der Transfektion beginnt mit der Kultivierung von Zellen in frischem Medium zwei Stunden vor der Elektroporation.
- Frische Kulturplatten werden mit Poly L-Lysin beschichtet.
- Die zu transfizierende DNA, ungefähr 3-5 µg pro 300 µl Zellsuspension, vorbereiten.
- Anschließend werden die Zellen von 14 cm Platte abgelöst und verdünnt, so daß sich 3 Mio. Zellen in 300 µl Kulturmedium befinden.
- Zu 300 µl Zellsuspension werden zu 10 µg DNA dazugemischt, die Suspension für 2 min bei RT inkubiert und anschließend in eine Elektroporationsküvette (4mm) überführt.
- Die kalte Küvette wird in das Elektroporationsgerät (in unserem Fall der Genpulsgerät der Firma Biorad) gebracht und einen elektrischen Puls gegeben. Die Parameter für Hela-Zellen waren dabei 200 V bei 960 µF.
- Nach dem Elektroschock wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete 10 cm Kulturschalen ausplattiert und bis zur Analyse für 24 h bis 36 h im Brutschrank bei Standardbedingungen inkubiert.

Lipofektamin–Transfektion von Plasmid-DNA

Zellen können Lipide mit DNA zusammen aufnehmen. Bei dieser Methode ist es wichtig, daß die Zelldichte in der Kulturschale möglichst hoch und das optimale Verhältnis der zu transfizierenden DNA zu Lipid experimentell bestimmt wurde. Es wurde das LipofektaminTM 2000 Reagenz von GIBCOBRL verwendet.

- Der Vorgang ist für einen Transfektionsansatz in einer 6cm Schale beschrieben:
- Zellen eine Stunde vor Transfektion mit frischen normalem Medium inkubieren.
- pro Ansatz wird 4µg DNA mit 8 µl Lipofektamin 2000 vermischt, in einem Gesamttransfektionsvolumen von 500 µl.
- Vorverdünnungen pro Ansatz: DNA wird in 250 µl serumfreies OPTI-MEM verdünnt. Lipofektamin 2000 wird in 250 µl OPTI-MEM verdünnt. Nach der Verdünnung des Lipofektamin müssen DNA und Lipofektamin innerhalb von 30 min kräftig durch schnippen am Eppendorfgefäß vermischt werden.
- 20 min bei RT inkubieren
- In dieser Zeit Zellen mit serumfreiem OPTI-MEM waschen und Zellen mit 2ml dieses Mediums in den Brutschrank stellen.
- 500µl Lipofektamin-DNA Suspension auf die Zellen träufeln.
- 4-6 Stunden inkubieren.
- Zellen waschen und mit frischem Medium beschichten.

Etablierung stabil transfizierter Zelllinien mittels Chemoselektion

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten HeLa-Zelllinien wurden auf Hygromycin B- und G418-Resistenz selektioniert. Die HeLa-d190 Zelllinie wurde noch zusätzlich auf Zeomycin Resistenz selektioniert (Konzentration in Kulturmedium: Zeomycin 50 µg/ml; Hygromycin B 300 µg/ml, die an G418 1mg/ml).

Für die Entwicklung einer stabilen Zelllinie muß Fremd-DNA stabil in das Genom der Zelle integriert werden. Die Integration linearisierter Plasmid-DNA erfolgt ohne offensichtliche Präferenz bestimmter Integrationsorte im Genom, d. h. sie ist statistisch verteilt. Die Anzahl der Kopien pro Genom ist variabel. Zellen, die die Fremd-DNA eingebaut haben werden über einen Selektionsmarker selektioniert. Dazu kann man Resistenzgene gegen toxische Substanzen verwenden. Zellen, die keine entsprechende DNA integriert haben werden abgetötet. Das Resistenz vermittelnde Gen kann sich auf gleichen Plasmid wie das zu exprimierende Gen befinden, oder es wird mit dem zu untersuchenden Gen ko-transfiziert.

Bei der Ko-Ttransfektion wird ein hoher Überschuß des Plasmides mit dem Selektionsgen eingesetzt damit es möglichst wahrscheinlich ist, daß jede Zelle, die den selektionsspezifischen Phänotyp zeigt, auch die zu untersuchende DNA im Genom integriert hat:

- Zellen in einer etwa 80% konfluenten 6 cm Kulturschale werden mit 5 µg linearisierter Plasmid-DNA transfiziert. (Das Verhältnis von Selektionsplasmid zu fremden Gen betrug hierbei 1:3 oder 1:5). Die Inkubation mit dem Lipofektamin-DNA Suspension erfolgt für vier Stunden.
- Mediumwechsel auf 6cm Schalen.

Nach vier Tagen wurden die Zellen auf 10 cm Schalen umgesetzt und eine Selektion mit Zeomycin gestartet. (Zellen wurden zusätzlich, wegen schon integrierter Fremdgene unter Hygromycin und G418 Selektionsdruck gehalten.

- Nach 1-2 Wochen sind alle nicht resistenten Zellen abgestorben, und stabil transfizierte Klone als Kolonien erkennbar. Um Klone zu isolieren und anschließend separat zu expandieren, werden die Zellen zunächst mit PBS gründlich gewaschen, dann mit PBS (EDTA)-Lösung für etwa 2-3 min inkubiert. Die Zellen sollen sich gerade abrunden, nicht jedoch von ihrer Unterlage ablösen! Mit einer 20 µl Eppendorf-Pipette, die auf 10 µl eingestellt wurde, zieht man ca. 5 µl Medium an und setzt dann die Pipettenspitze auf die Kolonie. Durch sehr vorsichtiges Auf- und Abpipettieren werden die Zellen abgelöst und in 24-Loch-Zellkulturplatten transferiert, wo sie weiter unter Selektionsdruck expandiert werden.

Etablierung stabil transfizierter Zelllinien mittels FACS

Eine weitere Möglichkeit, stabil exprimierende Zellen zu isolieren, besteht in der Verwendung von Selektionsgenen, deren Genprodukte ein spezifisches Lichtsignal liefern. Die Erzeugung eines solchen Lichtsignals kann durch die Umsetzung eines entsprechenden Substrates durch ein Enzym wie z. B. der Luziferase erfolgen oder das Genprodukt fluoresziert selbst durch die Anregung mit einer monochromatischen Lichtquelle, wie dies beim Green-fluoreszent-Protein (GFP) der Fall ist. Das grünfluoreszierende Protein stammt ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria*. Der Vorteil bei der Verwendung von GFP, besteht bei darin, daß man lebende Zellen auf die Expression von GFP selektionieren kann, ohne sie zu beschädigen oder zu manipulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde 2eGFP als Selektionsgen verwendet und positiv transfizierten Zellen mit einem FACS („fluorescence activated cell sorter“)-Gerät isoliert. Dieses modifizierte GFP fluoresziert verstärkt („e“,enhanced) und besitzt eine Halbwertszeit von zwei Stunden („2“). In einem FACS-Gerät werden die Zellen zunächst vereinzelt in einen Durchflußstrom gebracht, der durch die Verwendung eines Piezo-Elementes in

einzelne Tropfen fragmentiert wird. Durch das monochromatische Licht eines Lasers der Wellenlänge 488 nm wird nun jeder Tropfen einzeln angeregt, wobei darin befindliche eGFP produzierende Zellen ein Emissionssignal der Wellenlänge 520 nm liefern. Tropfen, in denen man eine solche Emission nachweist werden nun elektrisch geladen und mit Hilfe eines elektrischen Feldes aus dem Hauptstrahl in ein Auffanggefäß abgelenkt.

Experimentell, begannen wir in dieser Arbeit zunächst mit der Transfektion von Expressionsplasmiden, die in unserem Fall 2eGFP unter der Kontrolle von P_{tet} hatten, in entsprechende Zelllinien mittels Lipofektamin-Transfektion. Transfizierte Zellen wurden über einen Zeitraum von mindestens 9 Tagen kultiviert. Nach diesem Zeitraum war davon auszugehen, daß das Signal der transienten Expression nicht mehr existiert und sich in dieser Population nun Zellen befinden in denen die 2eGFP-Expressionskassette stabil ins Genom integriert ist. Die Zellen wurden mit Doxizylin über Nacht induziert, von der Kulturschale abgelöst, sedimentiert und in Sortiermedium resuspendiert, so daß ca. 2 Mio. Zellen/ml vorliegen. Diese Zellsuspension wird anschließend durch einen Filter in ein Gefäß überführt, das an das FACS-Gerät angeschlossen werden kann. Die Zellen wurden durch Angelika Kehlenbach am FACS-Gerät des ZMBH aussortiert. Die isolierten Zellen wurden vom Gerät direkt in eine mit Antibiotikum-haltigen Medium befüllte Kulturschale transferiert, die nach Abschluss des Sortiervorgangs wieder in den Brutschrank überführt wurde.

Um eine Population mit über 90 % an 2eGFP positiven Zellen zu gewinnen, waren mindestens drei aufeinanderfolgende Selektionsrunden notwendig.

4.7.4 Quantifizierung von Transfektionsexperimenten

Herstellung von Zelllysaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Plasmid-kodierte Reportersysteme verwendet, um quantitative Aussagen über transkriptionelle Regulationseinheiten, die diese Reportersysteme kontrollieren, treffen zu können (eine Übersicht über Reportergene zur Analyse der eukaryotischen Transkription findet sich in ((Alam and Cook 1990). Dazu werden transfizierte Zellen lysiert und die Zellextrakte anhand biochemischer Reaktionen, die das betreffende Reportersystem katalysiert, analysiert.

Die Herstellung der Zelllysate sei im Folgenden erläutert:

- Waschen der Zellen in PBS.
- Adhärent gewachsene HeLa-Zellen werden durch Zugabe von Lysepuffer lysiert. Bei einer 3,5 cm Schale genügen 100 µl, bei einer 6 cm Schale sind 200-250 µl ausreichend.
- Inkubation für 5 Min. bei Raumtemperatur.
- Die Zellen werden mit einem Schaber von ihrem Untergrund abgelöst und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.
- Zentrifugation des Zelllysates in der Tischzentrifuge bei 13000 Upm für 30 Sek., um unlösliche Bestandteile zu entfernen.
- Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß.

Alternativ können die Zellen auch mit den üblichen Methoden abgelöst, sedimentiert und in Lysepuffer lysiert werden. Auch hier müssen noch die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation abgetrennt werden.

Das Luziferase-Reportersystem

Der Leuchtkäfers *Photinus pyralis* enthält ein Gen, das für das Enzym Luziferase kodiert (de Wet et al. 1987). Dieses Enzym katalysiert in Anwesenheit von Magnesium-Ionen und unter ATP-Hydrolyse die oxidative Decarboxy-lierung von D(-)-Luziferin zu Oxoluziferin. Durch diese Reaktion werden Photonen der Wellenlänge 562 nm freigesetzt, die sich in einem Bioluminometer quantifizieren lassen. Dabei ist die Menge der erzeugten Photonen direkt proportional zur Menge an Luziferase, solange sich das Substrat im Überschuß befindet, so daß dadurch die Expressionsstärke bestimmt werden kann. Diese lineare Korelation existiert über einen Messbereich von über fünf Größenordnung. Das Luziferase-Reportersystems hat eine extrem hohe Empfindlichkeit.

Die Luziferaseaktivität wird in Zell bzw. Gewebeextrakten transfizierter Zellen nachgewiesen.

- 10 µl Lysat werden in 250 µl Luziferase-Meßpuffer gegeben.
- Die Probe wird im Bioluminometer (BioLumat 9051, Fa. Berthold) nach automatischer Injektion des Substrates (100 µl einer wässrigen 125 mM Luziferin-Lösung) vermessen.
- Das emittierte Licht wird von einem "Photomultiplier" (Meßbereich von 390-620 nm) über 10 s gemessen, integriert und als relative Lichteinheiten (RLU) angegeben.

Das β -Galaktasidase-Reportersystem

Das *lacZ* Gen von *E. coli* lässt sich bei Verwendung von entsprechenden Transkriptionssignalen in eukaryotischen Zellen exprimieren. Es katalysiert die β -glykosidische Spaltung von Laktose und einiger analoger

Substrate in Monosaccharide. Man kann die Enzymaktivität über die Spaltung zweier analoger Substrate ermitteln:

Zur quantitativen Analyse der Enzymaktivität kam ONPG zum Einsatz, dessen Spaltung lösliches o-Nitrophenol freigesetzt, das sich bei 420 nm spektralphotometrisch quantifizieren lässt. Bei der Spaltung von X-Gal entsteht 5,5'-Bibromo-4,4''-dichloro-Indigo Farbstoff.

Quantifizierung der β -Galaktosidase-Aktivität in Extrakten transfizierter Zellen:

- In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß werden 10 μ l Zelllysate ad 100 μ l H₂O aufgefüllt, und mit 700 μ l Z-Puffer versetzt.
- Zugabe von 200 μ l ONPG-Lösung, mischen, und Inkubation bei 37°C bis eine Gelbfärbung eintritt.
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 500 μ l einer 1M Na₂CO₃-Lösung
- Bestimmung der OD₄₂₀ (und OD₅₅₀) im Spektralphotometer.

Die Enzymaktivität wird in Miller-Einheiten angegeben und errechnet sich wie folgt:

$$\text{Einheiten} = 1000 \cdot \frac{E_{420} - (1,75 \cdot E_{550})}{t \cdot V \cdot C}$$

E ₄₂₀	Extinktion des Enzymsatzes bei 420nm
E ₅₅₀	Extinktion des Enzymsatzes bei 550nm
t	Reaktionszeit (Min)
V	eingesetztes Probenvolumen (μ l)
C	Proteinkonzentration der Probe (μ g/ μ l)

4.8 Immunologische Techniken

4.8.1 Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)

Mit der ELISA –Technik kann Spezifität und Sensitivität der Bindung von Antikörpern an ein Antigen erfasst werden. Je nach Fragestellung kann man sowohl die Quantität eines Antigens als auch eines Antikörpers feststellen.

Als Erstes wird das Antigen auf einer Polystyrol-Platte immobilisiert. Die erste Spalte jeder Platte dient als Blindwert zur Äquilibrierung des Gerätes und wird daher nur mit Blockpuffer und nicht mit Antigen beschichtet. Anschließend, werden die Antikörper in einer Verdünnungsreihe aufgetragen und mit dem immobilisierten Antigen inkubiert um Gelegenheit zu bekommen spezifische Antigen/Antikörperkomplexe auszubilden. Die von dem Antigen gebundenen Antikörper werden über einen enzymatisch markierten sekundären Antikörper detektiert (indirekter ELISA), wobei die Menge an gebundenem Sekundärantikörper die Signalstärke der Farbreaktion beeinflusst.

Als Antigen wurden rekombinant in E. coli exprimierte und aufgereinigte MSP-1 Fragmente p83, p30, p38, p42, p19 verwendet. Die optimale Menge an Antigen, die zur Absättigung der festen Matrice führt wurde in Vorarbeiten bereits ermittelt (Türbachova, Dissertation 2000) und belief sich auf 100-200 ng Antigen/100 μ l.

- Antigen in Karbonatpuffer lösen und Platten mit je 100 μ l Antigenlösung pro Vertiefung (Konzentration 100ng/100 μ l) beschichten.
- 2 h RT und 2 h bei 4° C inkubieren.
- 2 * Waschen mit je 200 μ l Waschpuffer (1 * TBST)
- Blockieren der unspezifischen Bindung mit 100 μ l Blockpuffer (1% Magermilchpulver in TBST) und Inkubation für 1 h, RT

In dieser Zeit werden die Seren vorbereitet: Seren wurden 1:100 in Blockpuffer verdünnt. Für jedes Serum werden Doppelmessungen vorgenommen, so daß insgesamt 400 μ l pro Serum-Verdünnungslösung benötigt werden.

- Abpipettieren des Blockpuffers
- Ansetzen der Verdünnungsreihe direkt in den Platten: In die erste Reihe werden 200 μ l der Serum Ausgangsverdünnung vorgelegt. Der Rest der Platte wird mit je 100 μ l Blockpuffer beschichtet. Mit der 12-Kanal Pipette werden 100 μ l der Ausgangsverdünnung in der ersten Reihe entnommen und in die zweite Reihe pipettiert. Durch mehrmaliges auf- und ab-pipettieren mischen. Nun aus der zweiten Reihe 100 μ l entnehmen und mit dem Blockpuffer der folgenden Reihe vermischen. So entsteht eine 1:2 Verdünnungsreihe der Ausgangskonzentration von Serumantikörpern. Ausgehend von einer 1: 100 Verdünnung wird in der achten Reihe eine Verdünnung von 1: 12 800 erreicht.
- Inkubation ü.N., 4° C
- 4 * Waschen mit 200 μ l Waschpuffer.

- Beschichten mit 100 µl Ak Maus anti-human-AP-Konjugat (1:3500 in Blockpuffer verdünnt). Inkubieren für 1h, RT.
- 2 * Waschen mit Waschpuffer und anschließend 2* Waschen mit Substratpuffer.
- Die Farbreaktion wird katalysiert durch die Alkaline Phosphatase, die das Substrat p-Nitrophenylphosphat (NPP) hydrolysiert. Dafür wird 1mg/ml NPP in Substratpuffer gelöst und 1 h, RT bei Dunkelheit inkubiert.
- Stoppen der Reaktion mit 100 µl von 0,1 M EDTA.
- Photometrische Bestimmung des Farbsignals bei 405 nm im ELISA-Gerät.

4.8.2 Herstellung von MHC Klasse-I-/Peptid Komplexen

Die Tetramer-Technik ist eine sensitive Methode um die Frequenz antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen zu bestimmen (Altman et al. 1996). Die Methode charakterisiert CD8+ T-Zellen ausschließlich phänotypisch und liefert keine funktionellen Informationen. Prinzipiell handelt es sich um eine Rezeptor-Ligand Interaktion, bei der spezifische T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen über ihren rekombinant hergestellten Liganden markiert werden. Diese werden als MHC Klasse-I Moleküle (beim Menschen HLA Klasse-I) bezeichnet und befinden sich in vivo auf der Zelloberfläche auf der sie mit kurzen meist 9 AS langen Peptiden beladen sind. Diese Peptide stammen von proteolytisch abgebauten zytoplasmatischen Proteinen.

Der Ligand besteht aus drei Komponenten, schwere (heavy chain=hc) und leichte Kette (β2m) des HLA-Moleküls, und dem MHC-restringierten neun-AS langen Peptid. Die beiden Proteine werden in E. coli exprimiert, um aus Einschlusskörperchen (IBs) aufgereinigt zu werden. Es folgt die Rückfaltung der rekombinant produzierten HLA-Ketten zusammen mit dem Peptid (Garboczi et al. 1996). Die Rückfaltungsreaktion wird ankonzentriert, umdialysiert und biotinyliert. Anschließend werden die biotinylierten Komplexe über eine Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Erhaltene MHC I/Peptid Komplexe (Monomere) können in flüssigem N₂ schock-gefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die CD8+ T-Zell Färbung mit Streptavidin multimerisiert werden.

Expression und IB Präparation der HLA-A*0201hc und β2m Proteine

Für die Expression der HLA-A*0201 -und β2m-Kette in E.coli werden Plasmide pET 3a und pZE1.3 HLA-A2hc in Bakterien (Stamm W3110-Z1) transformiert. Mit einzelnen Klonen wurden 5 ml Bakterienkulturen angeimpft. Zur Herstellung größerer Proteinmengen werden Kulturvolumen von 0,5-1 l verwendet. Das Protokoll zur Expression und Aufbereitung von Einschlusskörperchen entspricht den beschriebenen Standardprotokollen zur Präparation von IBs.

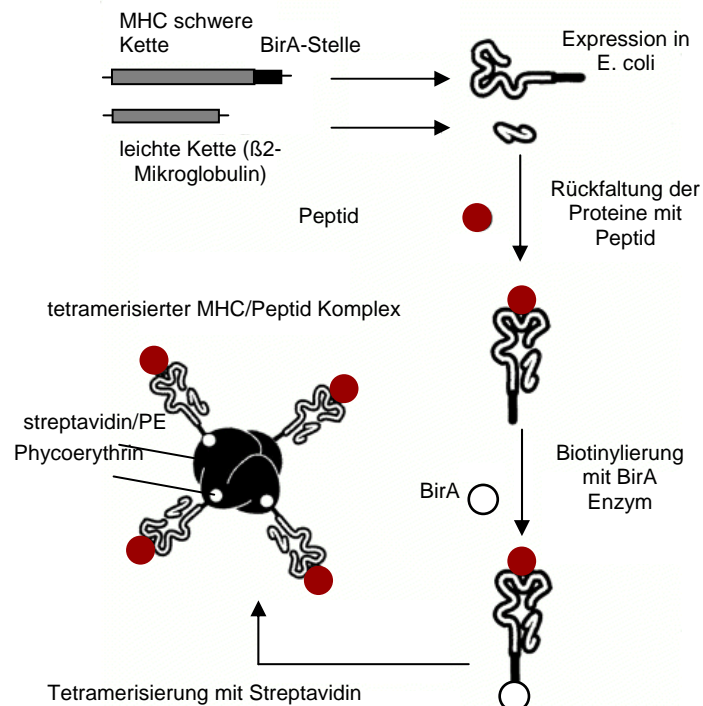


Abbildung 4-1 Herstellung von MHC/Peptid Komplexen (nach Lang and Bodinier 2001)

Rückfaltungsprotokoll

Die MHC-I Kette und $\beta 2$ -m werden in einem Faltungspuffer zusammen mit dem Peptid rückgefaltet um sich zu einem trimeren Komplex zusammen zu lagern. Die Rückfaltungsreaktion wird in einem Volumen von 150ml durchgeführt.

- In den zwischen 4-10° C temperierten und gerührten Faltungspuffer werden Proteaseinhibitoren PMSF, Pepstatin, Leupeptin hinzu gegeben.
- 6-7 mg lyophilisiertes Peptid wird in den Faltungspuffer gegeben.
- Die Menge an hc und $\beta 2$ m IBs werden kalkuliert. Insgesamt werden 13,45 mg hc und 9,9 mg $\beta 2$ m benötigt. Diese Mengen werden aufgeteilt: in je drei Aliquots. Vor jedem Schritt der Pulsrenaturierung wird ein Aliquot hc und ein Aliquot $\beta 2$ m genommen und 1:2 mit Guanidine Lösung verdünnt. Alle IB-Aliquots werden mit einer Spritze (27gauge Nadel) in den Faltungspuffer, dicht an den Rührer gespritzt. Vor den Pulsen wird die Rührstärke maximal erhöht, um die schwere Kette schnell zu verdünnen.
- Erster Puls: Ein $\beta 2$ m-Aliquot wird injiziert. Anschließend ein Aliquot hc.
- 10 Stunden Inkubationszeit unter langsamem Rühren.
- Zweiter Puls: $\beta 2$ m und hc-Aliquot wird nacheinander injiziert.
- 6-12 Stunden Inkubationszeit unter langsamem Rühren.
- Dritter Puls: $\beta 2$ m und hc Aliquot werden injiziert.
- Ungefähr 16-24 Stunden Inkubationszeit bei langsamem Rühren.
- Der 150ml Faltungsansatz wird bei 10000 rpm für 10 Minuten abzentrifugiert um ausgefallenes Protein zu entfernen. Die anschließende Ankonzentrierung und der Pufferaustausch finden in der Rührzelle statt.
- Ankonzentrierung des Faltungsansatzes auf 10ml.
- Zugabe von 90ml Tris-Puffer (Austauschpuffer).
- Ein zweites Mal auf 10ml ankonzentrieren und mit 90ml Austauschpuffer auffüllen.
- Wieder ankonzentrieren auf 10ml. (Der Ansatz kann zwischen durch in flüssigem Stickstoff Schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt werden).
- Die 10 ml Probe wird über einen 0,22 μ m Spritzenfilter von Aggregaten befreit.
- Ankonzentrieren auf 500-700 μ l in einem Microspin Gefäß (MWCO 10 000) bei 4000 rpm.
- Anschließend sollte die Biotinylierungsreaktion angesetzt werden.

Biotinylierung

Die rekombinant exprimierte schwere Kette ist eine mutagenisierte Form der ursprünglichen schweren Kette. Es fehlen Transmembran- und zytoplasmatische Domäne des Proteins. Anstatt dessen wurde eine Biotinylierungssequenz am C-Terminus eingeführt, die die spezifische Biotinylierung der monomeren MHC/Peptid Komplexe erlaubt. Die Biotinylierungsreaktion wird nach dem Protokoll des Enzymhersteller Firma AVIDITY durchgeführt. Alle Reagenzien werden über den Hersteller geliefert.

- Prinzipiell wird die auf 500-700µl konzentrierte Probe mit Bir A Enzym, d-Biotin und ATP über Nacht bei RT inkubiert.
- Da wir von ungefähr 400-600µg Monomer-Ausbeute pro 150ml Faltungsreaktion ausgehen, reichen 5µl BirA für eine effektive enzymatische Reaktion aus.
- Zusätzlich zu den Hersteller Puffer A, B und d-Biotin werden Proteaseinhibitoren (0,5 µl Pepstatin und 0,5 µl Leupeptin) in die Reaktion gemischt (für Stocklösungen s. Material).
- Die Effizienz der Biotinylierung wird nach der chromatographischen Reinigung in einem Streptavidin-shift Assay überprüft.

Aufreinigung der Monomere über Gelfiltrationschromatographie

Durch die Gelfiltration wird aus der biotinylierten Probe die MHC/Pepti-Komplex-Fraktion aufgereinigt und von Aggregaten, freier leichter Kette, sowie von BirA abgetrennt. Außerdem wird überschüssiges d-Biotin abgetrennt, welches sonst die Multimerisierung der Monomer-Komplexe mit Streptavidin behindern würde.

- Äquilibration der Superdex 75 Säule mit Äquilibrationpuffer (20mM Tris HCl, 50mM NaCl Puffer).
- Nach Auftragen der Probe wird die Chromatographie durch Zugabe von Äquilibrationpuffer mit Flussraten von 0,5-1,5 ml/min durchgeführt.
- Es erscheinen vier charakteristische Peaks: Bei einem Säulen-Ausschlussvolumen von 40ml werden hochmolekulare Aggregate aus der Säule gespült. Bei ungefähr 60ml kann die Monomer-Komplex-Fraktion eingesammelt werden. Es folgen ein hoher Peak, der hauptsächlich leichte Kette enthält und ein zweiter hoher Peak mit Bir A Enzym. Anschliessen erscheinen Peaks, die kleine Moleküle, wie freies Peptid enthalten.
- Der MHC-Peptid Peak wird eingesammelt und in einem Microspin Zentrifugationsröhrchen auf mindestens eine Konzentration von 0,1 µg/µl angereichert.
- Die eluierten Fraktionen der Chromatographie können vor dem Ankonzentrieren des Komplex-Peaks auf einem 12,5-15% PAA-Gel mit anschließender Silberfärbung überprüft werden.
- Nach der Bestimmung der Protein-Konzentration werden Proteaseinhibitoren, NaAzide und NaEDTA dazu gegeben.

Monomer-Komplexe können in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80° C gelagert werden.

Gel-shift Assay: Bestimmung der Biotinylierungseffizienz

In diesem Assay wird die Effizienz der Biotinylierung überprüft um eine gute Ausbeute an Tetrameren erhalten zu können. Man nutzt die extrem hohe Affinität der Biotin-Streptavidin Interaktion (10^{-14} M), die sogar unter Protein-Gelelektrophorese Bedingungen stabil bleibt.

Ein Aliquot des Monomer-Komplexes mit einem Strptavidin Überschuss führt zu einer schnellen Bindung aller biotinylierten Protein an Streptavidin. Im Proteingel wird dies sichtbar als „shift“ von Proteinbanden auf die Ebene größerer Standardproteine.

- zwei Aliquots (A-B) des Monomers von je 5-10 µg werden vorbereitet:
Inkubation A mit Streptavidin (50 µg) für 2 Stunden auf Eis. Dies gilt auch für die anderen Proben.
Inkubation B mit PBS
- Streptavidin alleine vorbereiten(50 µg)
- Zu allen drei Proben Proteinauftragspuffer dazugeben.
- Die Proben nicht Kochen!!!
- Auf ein 10% PAA Gel laden und mit Coomassie-Blau nfärben

Multimerisierung

Die aufgereinigten und biotinylierten Monomer Komplexe werden über Inkubation mit Streptavidin tetramerisiert. Ein Streptavidin-Molekül kann vier Biotine binden. Um eine möglichst hohe Ausbeute an tetramerisierten Komplexen zu erhalten, wird Streptavidin schrittweise, in kleinen Mengen, zu den Monomeren gegeben. Das End-Verhältnis Monomer zu Streptavidin sollte ungefähr 5:1 sein. Da, MHC-Tetramer Reagenzien normalerweise für die Durchflusszytometrie verwendet werden, sind Streptavidin-Moleküle mit Fluorochromen, in unserem Fall Phycoerythrin (PE), konjugiert. Tetramerisierte-Komplexe werden grundsätzlich bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt und sind mehrere Wochen haltbar.

Berechnung der Menge an benötigtem Streptavidin-PE für die Tetramerisierung:

Streptavidin MW 60.000
PE MW 240.000
MHC/Peptid Komplex MW 45.000

Beispiel: für 1,8 mg Monomer-Protein (40 nmol)

Streptavidin-PE: 40:5 = 8nmol Streptavidin-PE.

8nmol entsprechen 2400µg Streptavidin-PE

Die 2400 µg werden in 8 Aliquots von je 300 µg zu den Monomeren gemischt. Jeweils 15-20 min Inkubationszeit zwischen den Pulsen einhalten.

Färbung von CD8+ T-Zellen mit Tetrameren

Für die Färbung mit MHC-I Tetrameren werden lebende Zellen verwendet. Dabei kann je nach erwarteter Häufigkeit von positiven Zellen die Zellzahl variiert werden. Bei niedriger Frequenz werden mindestens $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Färbung benötigt. Die Färbung von CD8+ T-Zellen mit MHC-Tetrameren ist hoch spezifisch (Burrows et al. 2000) doch sollten negativ Kontrollen durchgeführt werden. Dazu können T-Zellen mit einer anderen Peptidspezifität, mit einer anderen Restriktion oder Proben angefärbt werden, die keinen Kontakt mit dem Antigen gehabt haben können., z.B. CD8+ T-Zellen von nicht-Malaria exponierten Individuen. Ausserdem, sollten in jedem Experiment Isotypkontrollen der verwendeten Antikörper und Einfachfärbungen durchgeführt werden. Ein anderer Punkt ist, daß Antikörper gegen CD8+ Rezeptoren häufig die Bindung von Tetrameren verhindern. Daher ist es für den antigenspezifischen Nachweis von CD8+ T-Zellen wichtig einen auf die Versuchsbedingungen optimierten anti-CD8+ Antikörper zu verwenden. Für alle Messungen am Durchflusszytometer werden zunächst Kompensationseinstellungen an Einfachfärbungen vorgenommen. Grundsätzlich werden gewaschene Zellen (s. unten) zuerst mit dem Tetramerreagenz inkubiert und anschließend erst mit anti-CD8-Antikörper gefärbt. Für die Färbung der T-Zellen mit Tetrameren wurden 1µg Tetramer-Reagenz/ 10^6 Zellen verwendet.

- Dies geschieht bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln.
- Anschließend sättigende Mengen an anti-CD8 Antikörper (ungefähr 10 µl/ 10^6 für 20 Minuten dazugeben
- Zellen mit FACS Puffer (s. Material) 2* waschen.
- Aufnehmen in 300-500 µl FACS-Puffer
- Zellen am FACS Gerät analysieren

Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Alle Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In 20 ml Blut erwartet man ungefähr $0,5 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^7$ isolierte Lymphozyten

- 20 ml ungerinnbar gemachtes Blut wird vorsichtig auf 20ml Ficoll Reagenz (FicoLite H s. Material) geschichtet in dem man es am Rande des Gefäßes langsam aus einer Pipette laufen lässt.
- Zentrifugieren bei 2800 rpm 20 min, ohne Bremse
- Die oberste Schicht, die Plasma und Thrombozyten enthält wird weitgehend abgenommen.
- Die Interphase, die die Lymphozyten enthält wird mit einer Pipette vorsichtig in kreisförmigen Bewegungen abgenommen und in einem bereitstehenden Gefäß 1:3 mit 1*PBS verdünnt. Die
- Interphase kann relativ großzügig abgenommen werden, in der Regel 3-7ml.
- Zentrifugation bei 1200 rpm, 10 min ohne Bremse.
- Zellpellet mit 45 ml 1*PBS waschen.
- Zentrifugation bei 1200 rpm, 10 min, mit Bremse.
- Die isolierten PBMCs können direkt weiter verwendet oder eingefroren werden.

4.8.3 Einfrieren und Auftauen von PBMCs

Alle Schritte werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die gewaschenen und abzentrifugierten PBMC werden zum Einfrieren in 1ml einkaltem FCS/10% DMSO je Cryoröhrchen resuspendiert. Nach den Aliquotieren werden die Röhrchen direkt in die Einfrierbox (s. Material) überführt und bei -80°C eingefroren.

- Zum Auftauen wird ein Cryoröhrchen im 37 °C Wasserbad angetaut und der Inhalt rasch in 45ml kalten FACSpufer überführt.
- Nach Zentrifugation bei 1200 rpm, 10 min wird erneut mit mindestens 20 ml FACS Puffer gewaschen.
- Es wird die Dichte an Lebendzellen bestimmt

4.8.4 Bestimmung der Lebendzellidichte: Trypanblaufärbung

Das Deckglas der Zählkammer wird angehaucht und durch Andrücken zur Haftung gebracht. Die Trypanblaulösung (s. Material) wird 1:1 mit PBS verdünnt. 20µl Trypanblau werden mit 20 µl Zellsuspension

vermischt und in den Raum zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Unter dem Lichtmikroskop wird die Anzahl der ungefärbten, vitalen Zellen gezählt und die Lebendzell-dichte nach folgender Formel bestimmt:
 Zelldichte der Zellsuspension = Zellzahl in einem Großquadrat * 2 (Verdünnungsfaktor) * 10^4 Zellen/ml.
 Isolierte Milzzellen wurden für die Bestimmung der Lebendzell-dichte wegen der höheren Zelldichte 1:20 mit Trypanblaulsg verdünnt.

4.8.5 Aufreinigung von Leukozyten aus der Milz

Zur Entnahme aller Organe werden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, in 70% Ethanol getaucht und die Leibeshöhle bzw. der Brustkorb unter sterilen Bedingungen eröffnet. Milz wird in RPMI 1640 Medium (4°C) überführt. Das Organ wird daraufhin mit Hilfe eines 5ml Spritzenstempels durch ein Sieb gedrückt, welches sich auf einem 50 ml Falcon Gefäß befindet. Mit RPMI 1640 Medium wird nachgespült und die Zellsuspension zentrifugiert (10min, 350g, 4°C). Das Milzzellpellet wird zur osmotischen Erythrozytenlyse je nach Größe in 5-10ml Lysepuffer (AKR-Puffer) aufgenommen und 90 Sekunden auf Eis inkubiert. Die Zugabe von 30-40 ml HBSS 3% FCS stoppt die Lyse. Die Lösung wird anschließend abzentrifugiert und mit RPMI 1640 Medium zweimal gewaschen (10min, 350g, 4°C). Je nach der Pelletgröße wurden die Zellen in 1-2ml Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

4.8.6 Stimulierung von Lymphozyten und Färbung von intrazellulären Zytokinen

Für die Anfärbung von intrazellulärem IFN- γ wurde der Cytofix/Cytoperm Kit von BD Biosciences verwendet. Das Protokoll bezieht sich auf Maus-Lymphozyten, die aus der Milz gewonnen wurden.

Es werden mindestens 5×10^6 Lymphozyten/Ansatz in MEM- α Komplett Medium in 24-well Schalen kultiviert. Zusätzlich enthält das Medium Peptid (10^{-5} M) und GolgiPlug (1:1000 Verdünnung). GolgiPlug (Brefeldin A) ist ein Proteintransport-Inhibitor, der die Ansammlung von IFN- γ im Cytoplasma fördert.

- Stimulieren für 6 Stunden. Stimulierung über Nacht ist auch möglich.
- Die Zellen werden abgelöst und pelletiert bei 1200UpM, 5 min, RT
- Resuspendieren der Zellen in Färbe-Puffer
- Blockieren der Fc-Rezeptoren zur Reduktion unspezifischer Bindungen: Inkubieren der Zellsuspension mit $1\mu\text{g}/10^6$ Zellen in 100 μl Färbe-Puffer; 15 min, 4 °C
- 1 * Waschen mit Waschlösung
- Anfärbung von Oberflächenrezeptoren mit Fluorochrom-konjugiertem Antikörper gegen CD8.: Das Pellet wird in 100 μl Färbe-Puffer resuspendiert und nach Zugabe der vom Hersteller empfohlenen bzw. in Vorversuchen ausgetitrierten Menge an Antikörper für 30 min, 4°C inkubiert.
- 2 * Waschen mit Färbe-Puffer und pelletieren 1200 UpM, 5 min, RT
- Die Zellen werden nun mit einer Lösung (BD Cytofix/Cytoperm Solution), die 4% Paraformaldehyd enthält, fixiert und permeabilisiert. Inkubieren für 20 min, 4 °C
- Waschen mit 2 * mit 1 * BD Perm/Waschlösung
- Färbung des intrazellulären IFN- γ : Pellet in 100 μl Perm/Waschlösung aufnehmen, 4 μl anti-IFN γ Antikörper /Ansatz; 30 min 4 °C
- 2 * Waschen mit 1 * BD Perm/Waschlösung und pelletieren
- Aufnehmen in 300 μl Färbe-Puffer und Durchführen der FACS-Analyse.

4.8.7 ELISpot

Der ELISpot (Enzyme-linked-immunospot-Spot) Test ist ein extrem sensitives Verfahren, um Zellaktivierung auf Einzelzellniveau zu messen. Bei dieser Aktivierung werden u.a. Zytokine, lösliche Polypeptide und Glykoproteine, die der Zellkommunikation dienen freigesetzt. Die von Zellen freigesetzten Proteine werden beim ELISpot durch zwei monoklonale Zytokinantikörper detektiert, die unterschiedliche Epitope dieses Zytokins erkennen. Der eine der beiden Antikörper ist beim ELISpot an eine feste Phase gebunden. Der ELISpot wird insbesondere eingesetzt, um eine genaue Quantifizierung von zellulären Reaktionen zu erfassen, etwa um einen Impferfolg zu messen. Lymphozyten werden nach der Impfung isoliert und mit, in diesem Fall, MSP-1 spezifischen Peptiden die HLA-A*0201 restringiert sind, stimuliert. Wenn Peptide von CD8+ Zellen erkannt werden, setzen diese Zytokine wie Interferon- γ (IFN- γ) frei, die detektiert werden.

- Durchführung bei Maus-Immunisierungsexperimenten:
- Vorbereitung der Peptid-Verdünnungen: Bei 9-10mer Peptiden: 1×10^{-3} M (entspricht ungefähr 1mg/ml). Vor Beginn des Assays nochmal 1: 10 verdünnen (10^{-4} M).
- Beschichtung der 96-well Platten mit erstem hoch-affinen Antikörper: Inkubation für 2 Stunden.
- Währenddessen Lymphozyten isolieren:
 Dazu werden die Milzen der immunisierten und nicht immunisierten Mäusen präpariert (s.oben). Die Milzen der nicht-immunisierten Mäuse werden als Antigen-präsentierende-Zellen (Antigen-presenting-cell (APC)) genutzt. Milzen der immunisierten Mäuse sollen mit diesen APCs stimuliert werden. Dazu

werden zunächst die Milzen der nicht-immunisierten Mäuse mit entsprechendem Peptid inkubiert. Das anschließende Kultivieren von extern-Peptid-beladenen APCs mit den Lymphozyten der immunisierten Mäuse aktiviert die Effektor T-Zellen.

- Nicht-immunisierte Mäuse-Milz (APCs) mit Peptid beladen: pro Peptid werden $2 \cdot 10^5$ Zellen/50µl Milzsuspension berechnet. Peptid (Konzentration 10^{-4} M) 1:100 mit APCs im Eppendorf Gefäß gut mischen um eine Endkonzentration des Peptids von 10^{-6} M zu erhalten. 4 Stunden 37 °C inkubieren.
- 96-well Platten waschen mit Aqua-dest. 15 min Einwirkzeit pro Waschgang.
- 96-well Platten Blocken: MEM- ∞ + 10% FCS 1 Stunde, 37 ° C.
- Immunisierte Mäuse Milzen (Effektor-T-Zellen) isolieren: pro Stimulierungsansatz $2 \cdot 10^5$ Zellen/50µl Milzsuspension berechnen.
- 96-well Platten waschen.
- 96-well Platten pro well:
 - + 50µl MEM-a 5%FCS (Pen/Strep + 1% Hepes beschichte)
 - + 50 µl APC/Peptid
 - + 50 µl Effektor-T-Zellen

Inkubieren bei 37° C ü. N.

Am nächsten Tag:

- Platten 10 * Waschen mit Waschpuffer.
- Der zweite biotinylierte Antikörper wird zugegeben. 2Stunden RT.
- 5 * Waschen mit Waschpuffer
- Pro well 50µl HRPO-Streptavidin Konjugat hinzu geben. 2h, RT.
- Ein präzipitierendes Substrat wird zugegeben:
 - + 50µl AEC-DMF Lösung/well.
- 5-30 min, RT inkubieren.
- 3 * Waschen mit aqua-dest.
- Trocknen der Platte

Auszählen der Spots mit dem Lichtmikroskop.

4.8.8 Immunfluoreszenzmessungen am Durchflusszytometer

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Untersuchung der Zellgröße, Granuliertheit und der Immunfluoreszenzmarkierung einzelner Zellen in Suspension. Mittels spezieller Fließparameter werden die Zellen einzeln an einer monochromatischen Lichtquelle (Argon-Laser $\lambda = 488\text{nm}$ bzw. Helium-Neon-Laser $\lambda = 635\text{nm}$) vorbeigeführt. Die Streuung unter einem Winkel von $2-10^\circ$ des geradewegs durch die Zelle gehenden Strahles, dem sogenannten „*forward scatter*“ (FS), gibt Hinweis auf die Zellgröße. Die Streuung des Lichtstrahles unter einem Winkel von 90° , dem sogenannten „*sideward scatter*“ (SS), ermöglicht Rückschlüsse auf die Granulierung der Zelle. Fluorochrome, die zur Immunfluoreszenzmarkierung von Zellantigenen verwendet werden, können durch das

Laserlicht kurzfristig in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang des Fluorochroms zurück in den Grundzustand wird die Energie in Form eines Photons mit einer charakteristischen Wellenlänge frei.

Diese Photonen werden von hochempfindlichen Photozellen (Photomultiplier) detektiert. Diese Messung von Größe, Granulierung und Fluoreszenzintensität ermöglicht eine Charakterisierung der Zellen.

5 Ergebnisse

5.1 Humorale Immunantwort gegen MSP-1 bei malaria-exponierten Personen

In unserem Labor wurden zwischen 1988 und 1989 epidemiologische Studien mit Seren aus dem westafrikanischen Dorf „Safo“ in Mali durchgeführt (Früh et al. 1991; Tolle et al. 1993). In diesen Seren sollten die Antikörpertiter gegen MSP-1 bestimmt und hinsichtlich einer Korrelation mit Schutz vor Reinfektion mit *P. falciparum* analysiert werden. Innerhalb der Studien wurde das MSP-1-Antigen nur durch kleinere Proteinfragmente repräsentiert, die zwischen 29-245 Aminosäuren lang waren. Vor kurzem gelang die chemische Synthese des *msp-1*, indem die Gensequenz der humanen Kodonhäufigkeit angepasst und der AT-Gehalt von 76% auf 55% gesenkt wurde (Pan et al. 1999). Dies ermöglichte die Expression des gesamten *msp-1* Gens und der natürlichen Prozessierungsprodukte in *E. coli*. Mittels ELISA Technik sollten die Antikörpertiter der Seren aus Mali erneut gegen rekombinant hergestellte und gefaltete Prozessierungsfragmente p83, p30, p38, p42 und p19 des K1 (F) Allelotyps von MSP-1 evaluiert werden (s. Abb. 1-5 Sequenzdimorphismus der synthetischen *msp-1* Gene und (Abb. 5-1).

5.1.1 Aufreinigung von MSP-1F Fragmenten aus *E.coli*

Die chromatographische Aufreinigung der MSP-1-Fragmente p83F, p30F, und p19F beruhte auf der Bindung von Oligo-Histidinen an Ni^{2+} Chelat. Die verwendeten Expressions-Plasmide sind auf der Basis der pDS56-Vektoren aufgebaut (Stueber 1990) (kloniert von Dr. Pan und Dr. Ravot). Sie gestatten die Expression von MSP-1 Untereinheiten in Fusion mit sechs N-terminalen Histidinkodonen. Die Transkription wird über einen T5-Promotor des entsprechenden *E. coli*-Phagen sowie zwei lac-Operatorsequenzen gesteuert. Die Expression der *msp-1* Gene kann daher über IPTG Zugabe induziert werden. Die Produktion und Reinigung der Proteine p83F, p30F und p19F wurde unter Leitung von Dr. Weerasuryia in Zusammenarbeit mit Dr. Olek durchgeführt. Die pDS56-Expressionsplasmide wurden in den *E.coli* Stamm SG13009 transformiert und die Klone vereinzelt. Anschließend wurden 500ml *E.coli* Kultur bei einer OD600 von 0,5 mit IPTG induziert, geerntet und Einschlusskörperchen präpariert. Diese wurden solubilisiert und säulenchromatographisch aufgereinigt (Abb. 5-2).

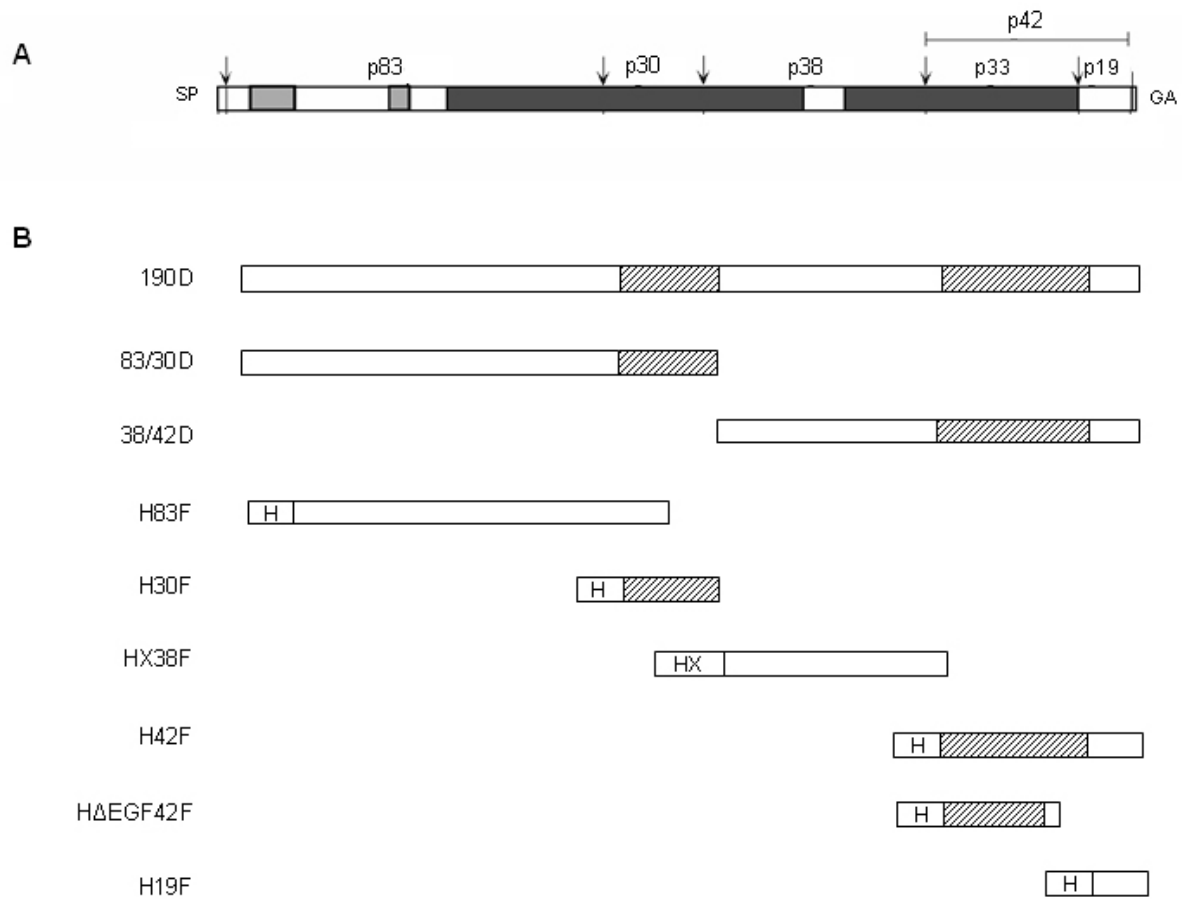


Abb. 5-1 Schematische Darstellung von MSP-1 und Übersicht über exprimierte Fragmente

A: Schematische Darstellung des MSP-1 Proteins. Eingezeichnet sind die nach der primären Prozessierung des Vorläuferproteins entstehenden Fragmente p83, p30, p38, p42 und die durch die sekundäre Prozessierung von p42 entstehenden p33 und p19 Fragmente. Die Stellen der proteolytischen Spaltung sind durch Pfeile markiert. Weiß, hellgrau und schwarze Kästen kennzeichnen jeweils konservierte, oligomorphe und dimorphe Regionen. Die Striche innerhalb von p19 sollen Disulfidbrücken der zwei EGF-ähnlichen Domänen darstellen. SP, Signalpeptid, GA, Sequenz zur Anheftung eines Glykosylphosphatidylankers. **B: Übersicht über MSP-1 Fragmente der FCB-1(F) und 3D7 (D)Version, die in dieser Arbeit hergestellt oder verwendet wurden.** Für chromatographische Aufreinigungen wurden His (H)-Tags an die Fragmente fusioniert. Das p38F hat zusätzlich nach dem H-Tag eine Faktor Xa Schnittstelle (X).

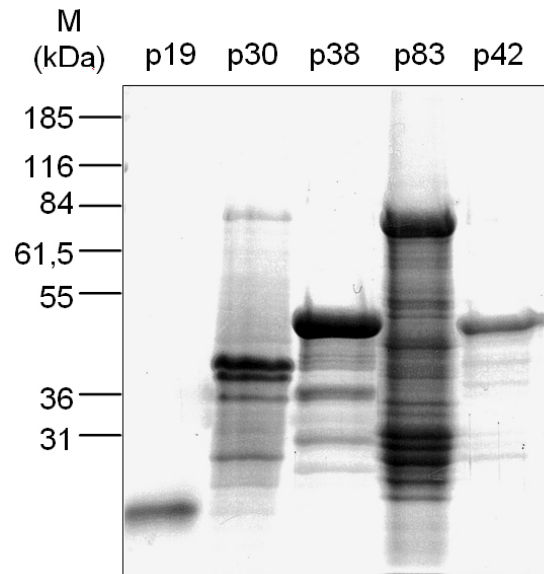


Abb. 5-2 Gelelektrophoretische Analyse aller für die ELISA-Analyse aufgereinigten MSP-1F Fragmente

Die Proteine p83F, p30F, p42F und p19F wurden in *E. coli* SG13009 mit den Plasmiden des pDS56 Vektorsystems exprimiert. p38F wurde in *E. coli* W3110Z1 mit dem Plasmid pZE13f-HX38 exprimiert. Gezeigt sind jeweils 1 µg der chromatographisch gereinigten Proteine, wie sie nachfolgend in den ELISAs verwendet wurden. Alle Proteine wurden unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf einem 10% PAA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsstandard

Aufreinigung des MSP-1 Teilfragments p38F

Da bei der Expression von p38F im pDS56 Vektorsystem Schwierigkeiten auftraten, wurde p38F mit einem anderen Expressionsvektor der pZ-Reihe prokaryotischer Expressionsvektoren exprimiert (Lutz and Bujard 1997). Die Transkription von p38F wird dabei über den $P_{AllacO-1}$ Promotor gesteuert, der durch IPTG Zugabe aktiviert werden kann. Zwischen His-Tag und *msp-1*-Sequenz wurde zusätzlich eine Schnittstelle für die Protease Faktor Xa eingefügt, um später die Histidine (His) von dem eigentlichen N-terminus des Proteins abschneiden zu können. Für die Klonierung von p38F wurde die p38 Kodierungssequenz mit spezifischen Primern aus dem Vektor pDS56 18/190-sp-ip amplifiziert, der die kodierende Gesamtsequenz von *msp-1* enthält. Die Primer waren zusätzlich am 5'Ende mit einer Cla I und am 3'Ende mit einer Pst I Restriktionsschnittstelle versehen. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen Cla I, Pst I und Xho I in zwei Fragmente geschnitten. Über eine Dreipunktligation konnten die Fragmente in den Basisvektor pZE integriert werden, so daß pZE13/f-HX38 entstand.

Zur Expression wurde Bakterienstamm W3110-Z1 (Lutz 1995) mit integriertem Lac-Repressor verwendet. Das MSP-1 Fragment p38 konnte in *E. coli* exprimiert werden: nach IPTG Induktion ist eine deutlich Bande der korrekten Größe zu erkennen (Abb. 5-3). Das Protein konnte sehr gut aus Einschlusskörperchen („Inclusion bodies“, IBs) der Bakterien gewonnen werden. Nach Rückfaltung von p38F und Dialyse in den Chromatographiepuffer waren nur noch wenig Verunreinigungen zu sehen (Abb. 5-3). Durch Ni-Chelat-Chromatographie konnte die Reinheit des Proteins nur noch unwesentlich gesteigert werden (Abb. 5-3, Spur Ni). Eine Westernblotanalyse mit einem anti-His-Tag Ak bestätigte, daß alle drei sichtbaren Banden p38F zugeschrieben werden können (Abb. 5-3, letzte Spur).

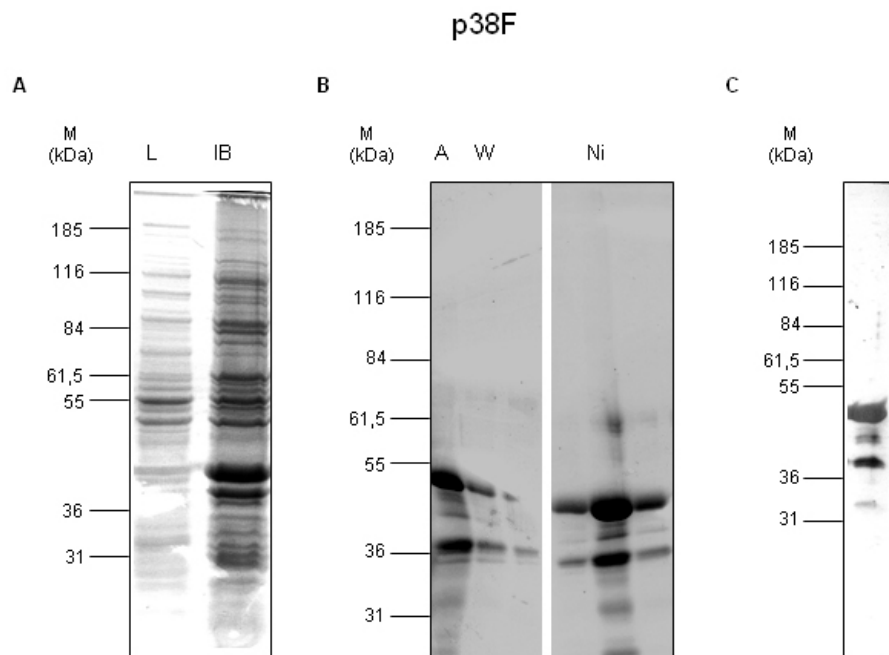


Abb. 5-3 Analyse von renaturiertem und aufgereinigtem p38F mittels Gelelektrophorese und Westernblot

E. coli W3110-Z1 wurden mit Plasmid pZE13/f-HX38 transformiert und bei 37°C kultiviert. Bei einer $OD_{600} = 0,3 - 0,5$ wurde durch Zugabe von IPTG die Expression für 3,5 h induziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem 12% PAA-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. **A:** Die linke Spur zeigt Gesamtzellextrakt (L) von *E. coli* W3110Z1 mit Plasmid pZE13/f-HX38, die in Abwesenheit (-) von IPTG kultiviert wurden. In der rechten Spur sind aufbereitete IBs zu sehen. **B:** Ni-Chelatchromatographie: Erste Spur zeigt renaturierte p38F IBs, die ü. N. in PBS dialysiert wurden vor Auftrag auf die Säulenmatrix (A, Auftrag). D, Durchlauf. In der rechten Spur ist das chromatographisch aufgereinigte Protein p38F zu sehen (Ni). **C:** Westernblot nach Auftrennung mit einem 12% PAA-Gel unter nicht-reduzierenden Bedingungen und Detektion des aufgereinigten p38F aus (B) mit einem anti-His-Ak.

Aufreinigung von p42F

Das Protein 42F wurde mit der oben beschriebenen Affinitätschromatographie und einer zusätzlichen Immunaффinitätssäule mit monoklonalen Antikörpern (mAk: 5.2) aufgereinigt. *E. coli* Stamm W3110Z1 wurde mit dem Plasmid pDS56RBSII-f-H42 transformiert, das die kodierende Sequenz der *msp-1* Untereinheit p42F trägt. Wie schon p38F war auch p42F nach Expression in *E. coli* unlöslich in Einschlusskörperchen konzentriert. Diese wurden solubilisiert, das Protein anschließend in einem Renaturierungspuffer rückgefaltet, so daß sich die Disulfidbrücken der EGF-Domänen bilden konnten. Das enthaltene p42F im Renaturierungspuffer enthaltene p42F wurde über Ni^{2+} -Chelat-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Rückgefaltetes p42F kann über in humanen Seren enthaltene konformationelle Antikörper detektiert werden. Ein monoklonaler Antikörper mAk5.2, der an eine Säulenmatrix gekoppelt war, detektierte speziell ein Epitop innerhalb der EGF-Domänen, so daß in einem zweiten Schritt ausschließlich renaturiertes p42F aufgereinigt werden sollte (Abb. 5-4).

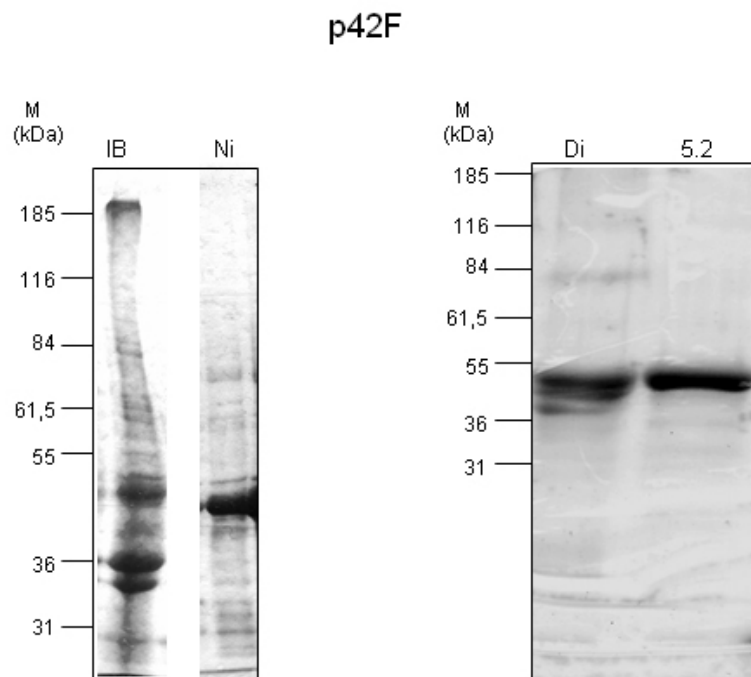


Abb. 5-4 Gelelektrophoretische Analyse von aufgereinigtem p42F

W3110Z1 wurde mit Plasmid pDS56RBSII-f-H42 transformiert und Expression von p42F durch IPTG-Zugabe für 3,5 h induziert. Die gelösten und umdialysierten IBs p42F wurden auf eine Ni^{2+} -Chelat-Affinitätschromatographie aufgetragen und p42F aufgereinigt. p42F enthaltende Fraktionen wurden anschließend vereinigt und in PBS, pH 8,0, umdialysiert. Es folgte eine Immunaффinitätschromatographische Aufreinigung von p42F mit Ak 5.2. Fraktionen wurden auf 10 % PAA-Gele unter reduzierenden Bedingungen (100 mM DTT) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt. Die linke Spur des ersten Gels zeigt Auftrag auf die Säule (IBs), in den folgenden Spuren p42F nach der Ni^{2+} -Chelat-Affinitätschromatographie (Ni^{2+}), nach der Dialyse (Di) und nach der Immunaффinitätschromatographie (5.2) (je ca. 1-3 μg).

5.1.2 Analyse der MSP-1F spezifischen Antikörpertiter in afrikanischen Seren-Epidemiologische Situation

Das Klima in Mali ist unterteilt in charakteristische trockene und regenreiche Wetterperioden. Die Regensaison dauert von Juni bis Oktober, die Trockensaison von Mai bis November. Mit Beginn der Regensaison steigt die Malariaübertragungsrate steil an und sinkt während der Trockensaison auf null. Die untersuchten Seren wurden am Ende der Trockenzeit im Mai 1989 gesammelt (Früh, Dissertation 1990) und (Tolle, Früh et al. 1993). Es ist bekannt, daß zwei Allelotypen von *msh-1* existieren (K1 und MAD20) (Tanabe et al. 1987). Das vorherrschende Parasitenisolat des untersuchten malaria-endemischen Gebietes war vom MAD 20 Prototyp (Früh, Doumbo et al. 1991). Insgesamt analysierten wir 148 Seren, von Personen unterschiedlichen Alters, wovon 24 zum Zeitpunkt der Blutabnahme mit *Plasmodium* parasitiert waren. Anhand der Antikörpertiter liesse sich prospektiv testen, ob Probanden mit einem anfänglich hohen Antikörpertiter am Ende der Regensaison weniger häufig parasitiert sind als Probanden mit einem niedrigeren Antikörpertiter. Wäre das der Fall, könnte man eine Korrelation von hohem Antikörpertiter und seltenerer Parasitämie beobachten, und Antikörper würden vor Parasitenbefall schützen. Eine Parasitämie führt generell zu hohen Antikörpertitern und würde damit die Aussagekraft prospektiver Analysen einschränken. Um also

die Ausgangssituation der verschiedenen Altersgruppen vor der Malariasaison vergleichen zu können, sind in den folgenden Analysen nur Werte parasitenfreier Individuen abgebildet. In Abb. 5-5 ist die Altersverteilung der Probanden dargestellt.

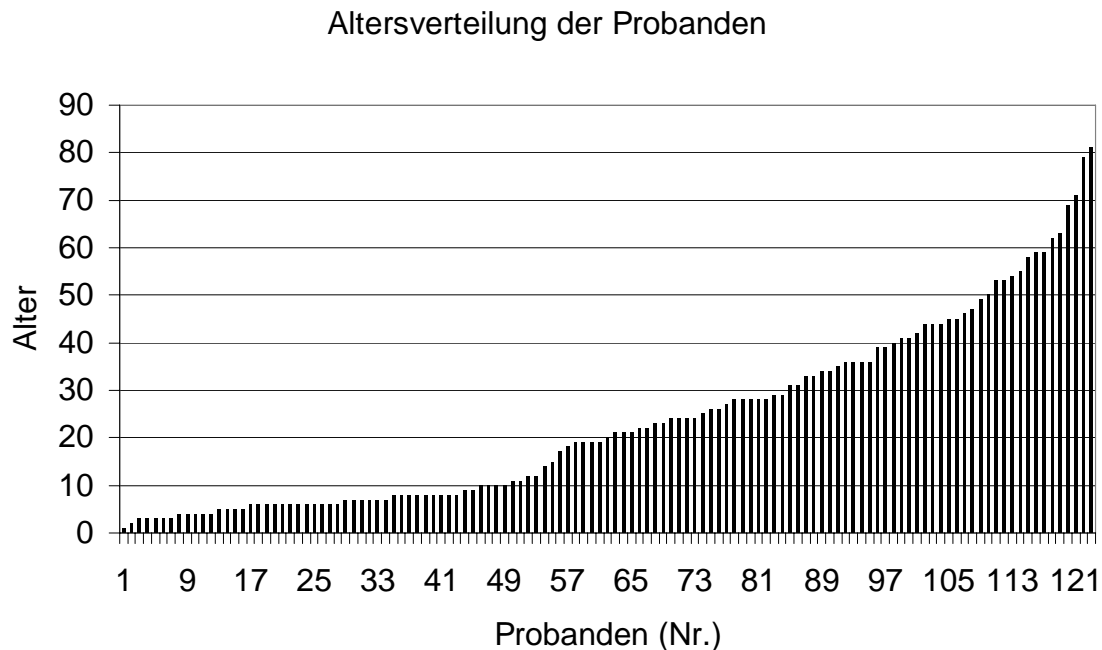


Abb. 5-5 Altersverteilung der Probanden

Dargestellt ist die Anzahl der Personen eines bestimmten Alters (parasitiert und nicht parasitiert). Die Gesamtzahl der Probanden betrug 148.

Humorale Immunantwort gegen MSP-1F Fragmente

Antikörpertiter gegen verschiedene MSP-1 Untereinheiten sind in Abb. 5-6 dargestellt. In allen Seren fanden wir Antikörper gegen sämtliche Fragmente von MSP-1. Die Antikörperspiegel einzelner Individuen der verschiedenen Altersgruppen variierten stark, wie die große Standardabweichung von den Durchschnittswerten in Abb. 5-6 zeigt.

20 Kontrollseren nicht Malaria-infizierter Europäer enthielten ebenfalls MSP-1-spezifische Antikörper. Um eine mit afrikanischen Seren vergleichbare Immunsituation zu schaffen, wurden für die europäischen Kontrollseren Probanden rekrutiert, die Virus-infiziert waren. In diesen Kontrollseren wurden vor allem gegen Fragmente p42F und p38F auffällig starke Kreuzreaktionen gemessen. Für die Untereinheit p42 ist dies ein bekanntes Phänomen (Tolle, Dissertation 1994). Die Struktur der EGF-Domänen in diesem Abschnitt des Proteins (er enthält 12 Cysteine), könnte eine Erklärung für das Auftreten von kreuzreaktiven Antikörpern sein. Wie in Abb. 5-6 zu sehen ist, waren die positiven Reaktionen gegen p42F bei Kindern bis fünf Jahre kaum höher als in europäischen Kontrollseren. Bei einer Verdünnung der Seren von 1/1600 wurden bei den afrikanischen Kleinkindern lediglich OD-Werte von $\leq 0,2$ gemessen. Erst in der darauf folgenden Altersgruppe von sechs bis zehn Jahren lagen die durchschnittlichen Antikörperspiegel gegen p42F deutlich über den Kontrollwerten. Gegen p83F, das mit 83 kDa weitaus größer ist als p42F, lagen bei den Kontrollseren die schwächsten kreuzreaktiven Immunantworten vor. Interessanterweise waren die Negativkontrollen im Durchschnitt auch gegen p19F niedrig, so daß entweder die kreuzreaktiven Epitope nicht in

den EGF-Domänen liegen oder die EGF-Domänen in rekombinant hergestelltem p19F nicht richtig gefaltet waren.

Mit zunehmendem Alter stiegen Antikörpertiter gegen den C-terminalen Bereich von MSP-1, linear an (s. p42F und p19F). Die Unterschiede an Antikörpertitern zwischen parasitierten und nicht-parasitierten Individuen wurde mit dem Alter immer geringer (nicht gezeigt). Die Menge an anti-p42F ist bei den afrikanischen Kindern (0-5 Jahre) 2,5-mal höher als die Menge an anti-p19F Antikörper. Dieser Unterschied gleicht sich mit zunehmendem Alter immer mehr an. Während für p42F und p19F die Stärke der humoralen Immunantwort mit dem Alter der Probanden linear anstieg, galt das nicht für die anderen drei Untereinheiten p83F, p30F, p38F. Die Antikörperspiegel gegen Fragmente p83F und p30F waren in den ältesten Individuen zwar höher als in der Gruppe der Kleinkinder (0-5). Aber die Zunahme war nicht linear und nicht so deutlich wie für den C-terminalen Bereich von MSP-1. Bei Untereinheit p38F war kein altersabhängiger Anstieg der Antikörpertiter festzustellen.

Die höchsten absoluten Titer wurden gegen MSP-1 Fragment p83F gemessen. Wegen seiner Größe enthielt das Protein vermutlich die meisten Epitope. Während schon bei der jüngsten Altersgruppe relativ hohe Antikörperspiegel gegen die Proteine p83F, p30F und p38F gemessen wurden, entwickelte sich die Immunantwort gegen die C-terminal liegenden Fragmente p42F und p19F insgesamt langsamer und begann bei den Kleinkindern bei einem niedrigeren Niveau. Interessanterweise, detektierten wir bei Kleinkindern, die ja nur eine vergleichsweise kurze Malaria-Krankengeschichte haben, hohe Antikörpertiter vor allem gegen das Fragment p83F, obwohl die Proben am Ende der Trockensaison gesammelt wurden und die Kinder vermutlich monatelang wenigen oder gar keinen Infektionen ausgesetzt waren.

Zusammenfassend liessen sich, wie zuvor beschrieben in Kindern insgesamt niedrigere Antikörpertiter gegen MSP-1-Fragmente als in Erwachsenen detektieren, die hohe Titer aufwiesen. Bei den Fragmenten p19F und p42F war eine altersabhängige Steigerung der Antikörpertiter zu beobachten, während die Titer bei p30F, p38F und p83F schon bei den Kindern hoch waren und sich mit wachsendem Alter der Probanden nicht mehr deutlich erhöhten. Dies deutet auf eine unterschiedliche Immunogenität der verschiedenen MSP-1 Fragmente hin.

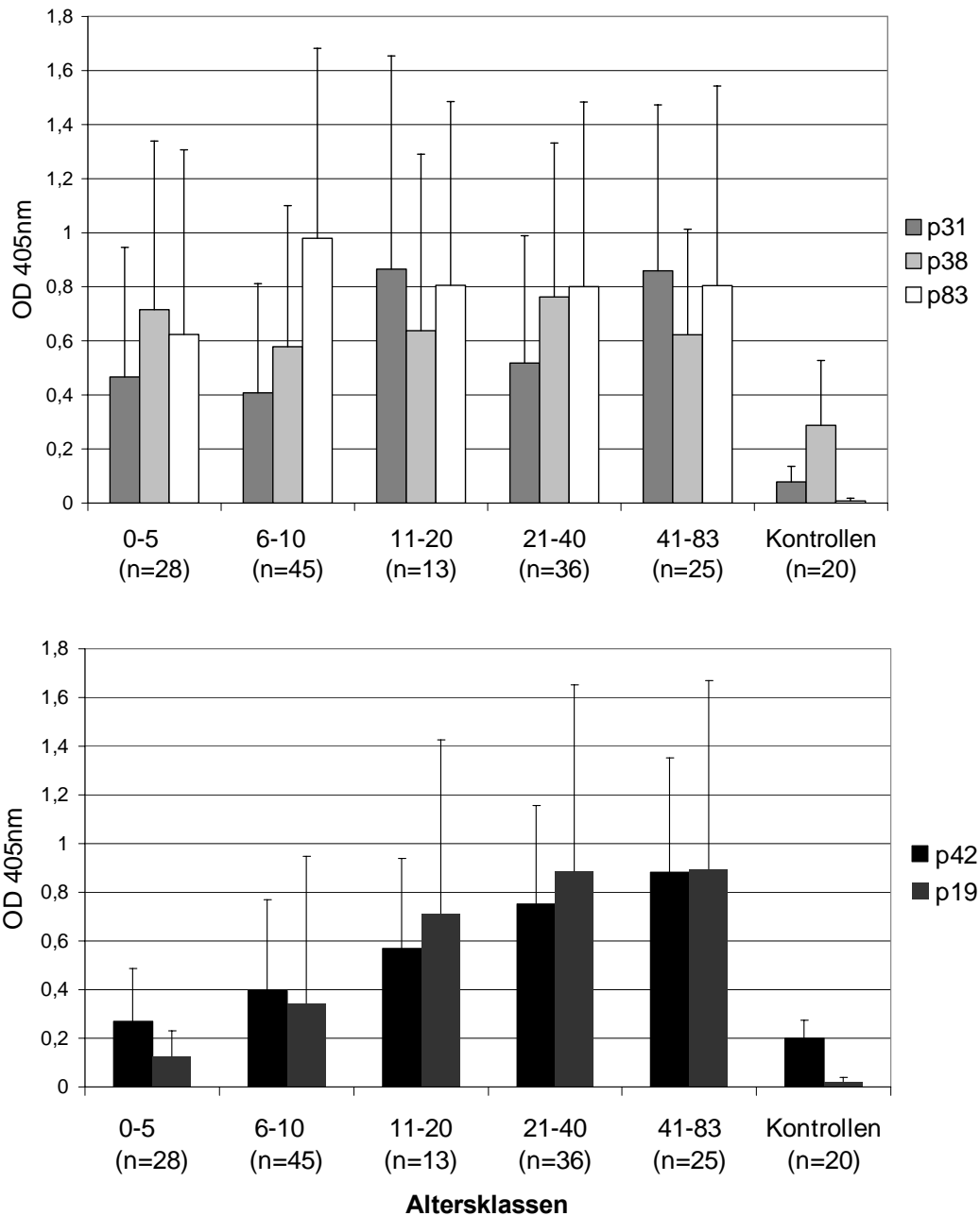


Abb. 5-6 Antikörpertiter gegen MSP-1F Fragmente in verschiedenen Altersgruppen

Antikörpertiter humaner Seren gegen verschiedene MSP-1-Fragmente wurden mittels ELISA bestimmt. ELISA Platten wurden mit 1 µg/ml MSP-1-Antigen beschichtet. Seren wurden in einer Anfangsverdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Werte entsprechen arithmetischen Mittelwerten für die einzelnen Altersgruppen bei einer OD₄₀₅. Von Seren wurden Verdünnungsreihen hergestellt. Für p30F, p38F, p42F und p19F wurden die Seren 1:1600 verdünnt, für p83F 1:12800. Als Kontrolle diente für jedes MSP-1 Fragment der arithmetische Mittelwert aus 20 europäischen Kontrollseren. **A:** Durchschnittliche Antikörpertiter gegen MSP-1 Fragmente p30F, p38F und p83F in den fünf verschiedenen Altersgruppen (0-5; 6-10; 11-20; 21-40; 41-83). **B:** Durchschnittliche Antikörpertiter gegen die MSP-1 Untereinheiten p42F und p19F in den verschiedenen Altersgruppen.

5.2 Identifizierung von MSP-1 CD8+ T-Zell Epitopen

Die humane Immunantwort gegen *P. falciparum* besteht nicht nur aus einer B-Zell-, sondern auch aus einer T-Zell-vermittelten Komponente (Mahanty et al. 2003). Deshalb ist die Identifikation zytotoxischer T-Zell-Epitope innerhalb von MSP-1 interessant, die während einer *Plasmodium falciparum* Infektion zu einer schützenden Immunantwort beitragen können. Da MSP-1 schon im Leberstadium des Parasiten synthetisiert wird, besteht die Möglichkeit, daß Prozessierungsprodukte von MSP-1 mit MHC I (= HLA) Molekülen assoziieren und in der Leber an die Zelloberfläche transportiert werden. Dort könnten zytotoxische T-Zellen Komplexe aus MSP-1 Peptid und HLA-Molekül erkennen und eine infizierte Leberzelle beseitigen.

Die Auswahl der Peptide, die letztendlich an der Zelloberfläche präsentiert werden, hängt von mehreren Faktoren ab. Ein entscheidender Punkt ist, daß die Prozessierungsprodukte der Proteine die richtigen Aminosäuresequenzen aufweisen müssen, um an vorhandene HLA-Typen zu binden um anschließend als Komplex an die Zelloberfläche zu gelangen. Es gibt jedoch auch intrinsische Mechanismen, die unabhängig von der Peptidsequenz die Antigenpräsentation beeinflussen. Die physiologische Peptidselektion, wird z.B. auch über die Menge an prozessierungsfähigem Antigen in der Zelle und der Antigen-Prozessierungsmaschinerie selbst reguliert.

Um möglichst vielen dieser Faktoren Rechnung zu tragen, verfolgten wir zwei experimentelle Strategien. Die erste Strategie sollte die natürliche Prozessierung von MSP-1 in einer humanen Zelllinie, die als Modellallel HLA-A*0201 exprimiert, nachahmen. Mit dieser Vorgehensweise könnten immunogene Epitope von MSP-1 detektiert werden, die bei *in-silico* Vorhersagen nicht erkannt werden. Als zweite Strategie wurden über eine Computer-gestützte Vorhersage mit dem Programm SYFPEITHI MSP-1 Epitope identifiziert, die an das Allel HLA-A*0201 binden (Rammensee et al. 1999). Die beiden Strategien sollten sich gegenseitig ergänzen und die Ergebnisse validieren.

5.2.1 Etablierung einer *msp-1* exprimierenden Zelllinie für die physiologische Peptidselektion

Experimentelle Strategie

Ausgangspunkt war eine HeLa Zelllinie (HeLa/A2A2D^b = HeLa/A2Db) die ein chimäres HLA-A*0201 Molekül exprimiert: Transmembran- und zytoplasmatische Domänen stammen vom Maus H-2D^b, währenddessen die Epitop-bindenden Regionen menschlichen Ursprungs sind (Pascolo et al. 2001). Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise von Priv. Doz. Dr. S. Stevanovic zur Verfügung gestellt (Institut für Zellbiologie, Univ. Tübingen). Sie muß durchgängig mit G418- Neomycin (1mg/ml) kultiviert werden.

Es wurden zwei Zelllinien hergestellt, welche die Gensequenz für das 83/30 Fragment bzw. das 38/42 MSP-1 Fragment des 3D7 Isolats stabil in das Genom integriert hatten (s. Abb. 5-1 für Übersicht von MSP-1 Fragmenten). *msp-1* sollte Tetrazyklin-abhängig exprimiert werden. Das Tet-System besteht aus zwei Elementen der *E. coli* Tetrazyklin-Resistenz: dem tetrazyklin-induzierbaren Repressor Protein (TetR), der zu einem eukaryontischen Aktivator konvertiert ist (tTA oder rtTA), und den tetO Operator Sequenzen, die an einen RNA-Polymerase II Promotor fusioniert sind. Der daraus resultierende tTA/rtTA abhängige Promotor wird Ptet genannt (Abb. 5-7). Es wurde das rtTA System und nicht das tTA-System verwendet, damit die rekombinante Genexpression in den Zellen nicht ständig mit Induktor supprimiert werden muss, sondern bei Bedarf durch eine einmalige Doxzyklin-Gabe (Dox)

aktiviert werden kann (Gossen et al. 1995). Es sollte zunächst der reverse Transaktivator rtTA-2s-M2 stabil in das Genom der HeLa/A2Db integriert werden (Urlinger et al. 2000). Anschließend sollte eine Expressionskassette in die HeLa/A2Db-rtTA Linie integriert werden, die für ein Fusionstranskript aus GFP und *msp-1* kodiert. GFP sollte als Reportergen einer erfolgreichen genomischen Integration dienen. Auf Grund eines Stopcodons nach dem GFP-ORF wird anfänglich in den Zellen nur GFP translatiert. GFP-positive Zellen sollten im FACS Gerät selektiert und angereichert werden. GFP konnte zu einem späteren Zeitpunkt über zwei flankierende Rekombinations-Erkennungsstellen (loxP) deletiert werden. Erst dadurch sollte die Synthese von MSP-1 ermöglicht werden. In GFP-positiven Zelllinien sollte daher mit transient exprimierter Cre-Rekombinase das GFP-Gen deletiert werden. Potentiell *msp-1* exprimierende Zellen könnten nun durchflusszytometrisch als GFP-negative Zellen identifiziert werden.

Die Identifizierung präsentierter MSP-1-spezifischer Epitope auf HLA-Rezeptoren der so hergestellten Zelllinie sollte in Kooperation mit Prof. Rammensee erfolgen. Dort wird routinemäßig die „Predict-Calibrate-Detect“ (PCD) Methode zur Identifikation von z.B. tumor-spezifischen Epitopen angewendet: Computergestützt werden Peptide vorhergesagt, die in dem jeweiligen Protein an bestimmte HLA-Typen binden können. Mit den anschließend entsprechend synthetisierten Peptiden werden zwei hintereinander geschaltete Massenspektrometer kalibriert („Tandem MS“), denen ein nanokapillares HPLC vorgeschaltet ist. Extrahierte natürliche HLA-Liganden werden ebenfalls über das HPLC und MS analysiert. Antigen-assoziierte Peptide können nun über Ko-elution und kalibrierter Tandem-MS leichter entdeckt werden (Schirle et al. 2000).

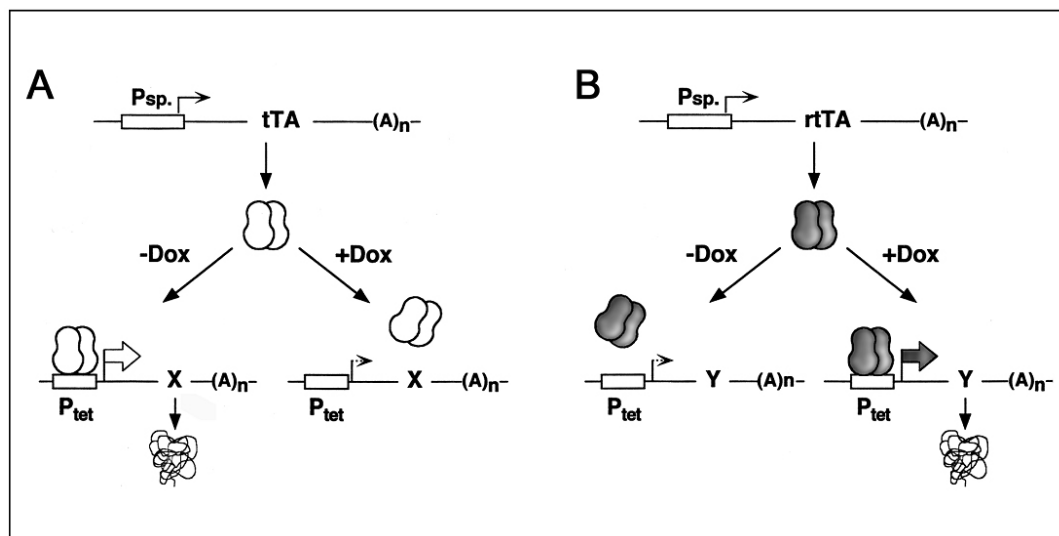


Abb. 5-7 Übersichtsgrafik: Tetrazyklin – kontrolliertes Genregulations System

A: Wirkungsprinzip des tTA-Systems. In Abwesenheit der Effektorsubstanz Doxzyzyklin (Dox) bindet ein Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator (tTA) an Tet-Operatorsequenzen innerhalb von P_{tet} und aktiviert dort Transkription von Gen X, in unserem Fall *msp-1*. In Gegenwart von Dox wird diese Bindung und damit die Aktivierung verhindert. **B:** Wirkungsprinzip der rtTA-Systems. rtTA unterscheidet sich von tTA durch 4 Aminosäuresubstitutionen im Bereich des Tet-Repressors, die ein revertiertes Bindungsverhalten an die Tet-Operatoren vermitteln. Dies führt zur Aktivierung der Tetrazyklin-abhängigen Genexpression in Gegenwart von Dox. (Abb. aus S. Berger, Dissertation 2003)

Konstruktion einer HeLa Zelllinie, die den reversen Transaktivator konstitutiv exprimiert

Zunächst musste eine HeLa Zelllinie generiert werden, die den reversen Transaktivator (rtTA) konstitutiv exprimiert. Es wurde ein Vektor hergestellt, in dem das rtTA2s-M2-Gen über eine interne ribosomale Bindestelle („internal ribosomal entry site“, IRES) mit einer Antibiotika-Resistenzkassette verknüpft ist, und somit beide Gene, sowohl Hygromyzin als auch rtTA, bicistronisch exprimiert werden. rtTA-M2 ist eine verbesserte Form des ursprünglichen reversen Transaktivators (Urlinger, Baron et al. 2000). Ausgehend von Plasmid SK-E/neo (Dr. Rainer Löw) wurde eine 5' untranslatierte Region des Enzephalo Myokarditis Virus (EMCV-IRES) mit dem Hygromyzin-Resistenz Gen verbunden. Hierfür wurde SK-E/neo mit NcoI verdaut und die überstehenden Enden aufgefüllt, so daß „blunt-ends“ entstanden, und mit Not I nachgeschnitten. Mittels PCR wurde das Hygromyzin-B-Phosphatase-Gen aus dem Vektor pCMVLacIrepressor amplifiziert (Plasmid von M. Scheuermann, Abteilung Molekulare Genetik, DKFZ), Not I verdaut und 5' blunt - 3' Not I in den vorbereiteten SK-E/neo Vektor ligiert. Das EMCV-IRES Element wurde in Plasmid pUHRt 62-1 (Dr. Baron und Dr. Hasan) kloniert. Aus SK-E/neo wurde das EMCV-IRES Element mit BamHI und Bgl II ausgeschnitten und mit pUHRt 62-1 Vektor ligiert, der mit BamHI linearisiert worden war. Vektor pUHRt 62-1 E/hyg, der rtTA konstitutiv exprimiert, ist in Abb. 5-8 dargestellt.

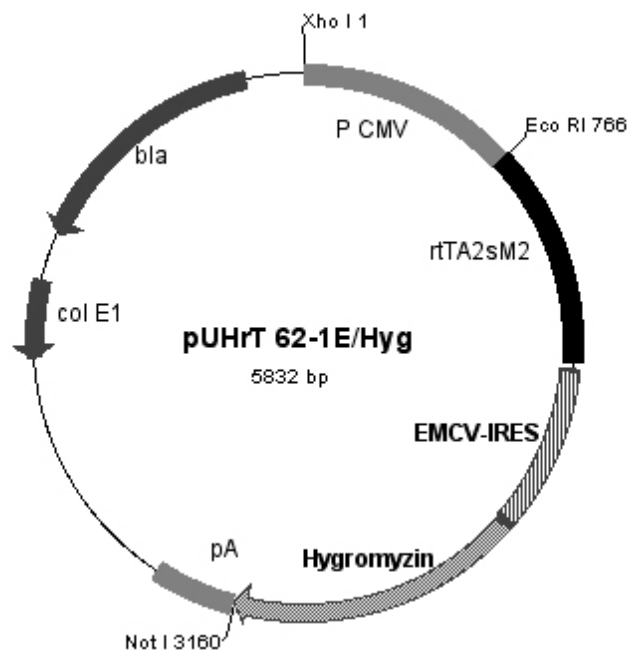


Abb. 5-8 Der rtTA Expressionsvektor

Dargestellt ist pUHRt 62-1 E/hyg. Die kodierende Sequenz der „M2“ Mutante des Tet Repressors, fusioniert an drei minimale Aktivierungsdomänen, steht unter der transkriptionellen Kontrolle des humanen CMV Promotors. Daran anschließend trägt das Plasmid eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) bestehend aus der 5' nicht-translatierten Region des Enzephalo Myokarditis Virus (EMCV-IRES), ein Hygromyzin Gen und dem Polyadenylierungssignal der späten Gene von SV 40. IRES bietet eine eigene Ribosomenbindestelle für die Translation des nachfolgenden Hygromyzin-Resistenz Gens. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid der Col E1-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E. coli* und das β -Lactamase Gen zur Selektion von *E. coli* auf Ampizillinresistenz. Relevante Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

rtTA-Vektor wurde mit einem PvuII Verdau linearisiert und für die stabile Transfektion aufgereinigt. HeLa/A2Db Zellen wurden mit 10ug Plasmid per Elektroporation transfiziert.

ziert und die Zellen mit 300ug/ml Hygromyzin im Medium kultiviert. 72 Klone, die resistent gegen Hygromyzin waren, wurden isoliert und auf konstitutive Expression von rtTA getestet. Um die Funktionalität von rtTA zu überprüfen, wurden diese Klone mit Plasmid pUHC13-3 transient transfiziert. In diesem Plasmid steht das Luziferase-Gen unter Kontrolle eines Tetrazyklin-regulierbaren Promotors (P_{tet}). Bei einem stabil integrierten reversen Transaktivator würde in Anwesenheit von Dox Luciferase exprimiert. Aktivität von Luziferase kann in Zellen nicht-invasiv mit d-Luziferin und einer „cool-charged-coupled-device“-Kamera („CCD“) nachgewiesen werden.(Bhaumik et al. 2004). Bei dieser Voranalyse war bei 26 Klonen von 72 ein deutliches Luziferasesignal meßbar. In den am stärksten leuchtenden Klonen wurde die Luziferaseaktivität quantifiziert (siehe unten).

Quantifizierung der Luziferaseaktivität in Abhängigkeit von Doxyzyklin

Unter den HeLa-rtTA2^S-M2 Klonen sollte eine transgene Linie identifiziert werden, die eine möglichst geringe Basal-Aktivität im nicht-induzierten Zustand mit einer hohen Aktivierbarkeit im induzierten Zustand verbindet. Zur quantitativen Analyse der Genregulation wurde Luziferase als Reportergen eingesetzt. Mittels Messung von Luziferase können Promotoraktivitäten in Zelllinien oder auch Geweben verlässlich gemessen werden, da die Aktivität des Enzyms über sechs Größenordnungen linear bestimmt werden kann. Um Klone mit dem besten Regulationspotential zu identifizieren, wurden sie einen Tag mit und ohne Dox kultiviert und mit dem Reporterkonstrukt pUHC13-3 transient transfiziert (s. oben). Von den untersuchten Klonen zeigten alle zwölf eine Dox-induzierbare Luziferaseaktivität. Im abgeschalteten Zustand bewegten sich die Luziferaseaktivitäten im Bereich von 10^5 und 10^6 rlu/ug Gesamtprotein. Die besten Klone erreichten Expressionsunterschiede von 400-600fach (Abb. 5-9). Mit einem durchschnittlichen Regulationfaktor von 538 in drei unabhängigen Luziferase Assays wies Klon 1 konstant gute Dox-abhängige Induzierbarkeit auf und wurde für eine zukünftige stabile Expression von *msp-1* ausgewählt. Um die Stabilität der rtTA-Expression zu testen, wurde dieser Klon für zwei Wochen ohne Hygromyzin kultiviert. Die anschließende Messung der Luziferaseaktivität ergab eine reduzierte Induzierbarkeit. Daher wurde die Zelllinie von da an konstant mit Hygromyzin auf die stabile Integration der rtTA-Kassette selektioniert. Die so etablierte HeLa Zelllinie wurde HRM-10 genannt.

Regulationspotential der stabil rtTA exprimierenden Klone

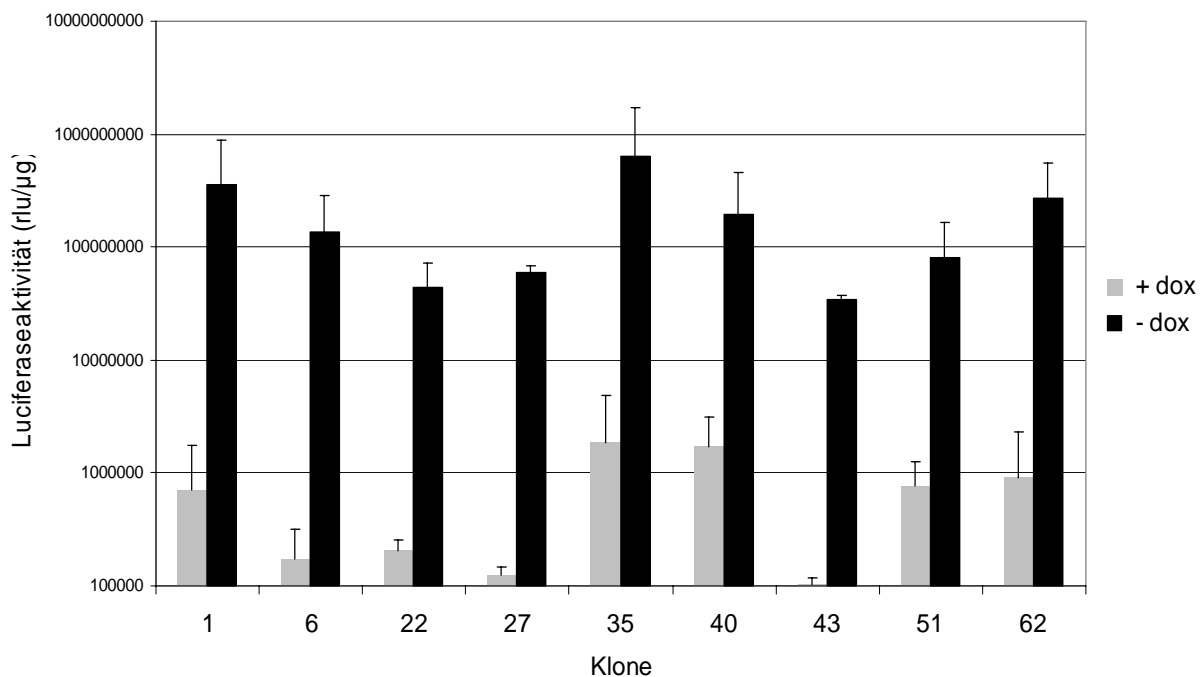


Abb. 5-9 Vergleich der Luziferaseaktivitäten von HeLa rtTA2s-M2 Klonen

HeLa/A2Db Zellen transgen für den rtTA^s-M2 Regulator wurden transient mit dem Tet-regulierbaren Luziferase-Reporterplasmid pUHC13-3 transfiziert. Um die Regulationsfähigkeit der verschiedenen HeLa Klone zu testen wurde mit je 1 µg/ml Doxzyklin über Nacht induziert. Anschließend wurde in Zelllysaten Luziferaseaktivität bestimmt. Abgebildet sind die durchschnittlichen Luziferaseaktivitäten aus zwei unabhängigen Experimenten normiert auf den Proteingehalt der Probe. Klon 1 wurde in drei verschiedenen Ansätzen auf seine Regulationsfähigkeit und Stabilität geprüft. Die unterschiedlichen HeLa rtTAs-M2 Klone wurden nicht induziert (hellgrau) und induziert (schwarz). Über den Balken ist der Regulationsfaktor des jeweiligen Klon wiedergegeben. Aus Klon 1 wurde die HRM-10 Zelllinie abgeleitet.

Klonierung des *msp-1* Expressionsvektors

Die Konstruktion der Expressionsplasmide für eine rtTA kontrollierte *msp-1* Expression erfolgte in mehreren Schritten, die in Abb. 5-10 schematisch dargestellt sind. Im Plasmid pUHR 1.7(36)-CL (Dr. Löw) wird Luziferase über den humanen CMV-Promotor Tet-abhängig exprimiert. Der Ausgangsvektor pUHR 1.7(36)-CL wurde mit Sal I/Xba/ geschnitten und das Luziferase-Gen durch ein synthetisches Oligonukleotid ersetzt. Dieses Oligonukleotid wurde durch Hybridisierung der DNA-Oligonukleotide Oligo1A und 1B hergestellt. In dem resultierenden Plasmid pUHR1.7(36)-CL+1.Oligo sind vor das Luziferase-Startcodon Rekombinations-Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase und neue Restriktionsschnittstellen eingeführt, die zur Integration des GFP und eines zweiten synthetischen Oligonukleotids dienen. Nach der 5' Lox-Rekombinationsstelle ist in der Sequenz des Oligo 1 ein zusätzliches Thymidin vorhanden, um ein Startcodon zu vermeiden. Zunächst wurde aus einem Plasmid mit dem GFP-Gen (SK-N/d2G*, Dr. Löw) die GFP-kodierende Sequenz mit Asc I/Bgl II freigesetzt. Das in pUHR 1.7(36)-CL eingesetzte Oligonukleotid 1 wurde mit Asc I und Bgl II aufgeschnitten und mit den entsprechenden kompatiblen Enden GFP einligiert. In diesen pUHR1.7(36)-CL Vektor mit dem 1.Oligo wurde zwischen die Schnittstellen Spe I und Xba I ein zweites Oligonukleotid, ebenfalls durch Hybridisierung von zwei komplementären

synthetischen Oligonukleotiden 2A und B, integriert. Das Oligonukleotid enthielt Schnittstellen, die für die Integration von MSP-1D Fragmenten notwendig waren. Das entstehende Plasmid wurde mit Bam HI und Cla I verdaut und die kodierende Sequenz der MSP-1 Proteinfragmente d-83/30 und d-38/42 mit Bam HI und Cla I aus den Plasmiden pZE 2.1*/d-H83/30 und pZE 2.1*/d-H38/42* freigesetzt (beide von Dr. (Westerfeld 2002) und gerichtet in den Vektor pUHR1.7(36)-CL + 2.Oligo kloniert.

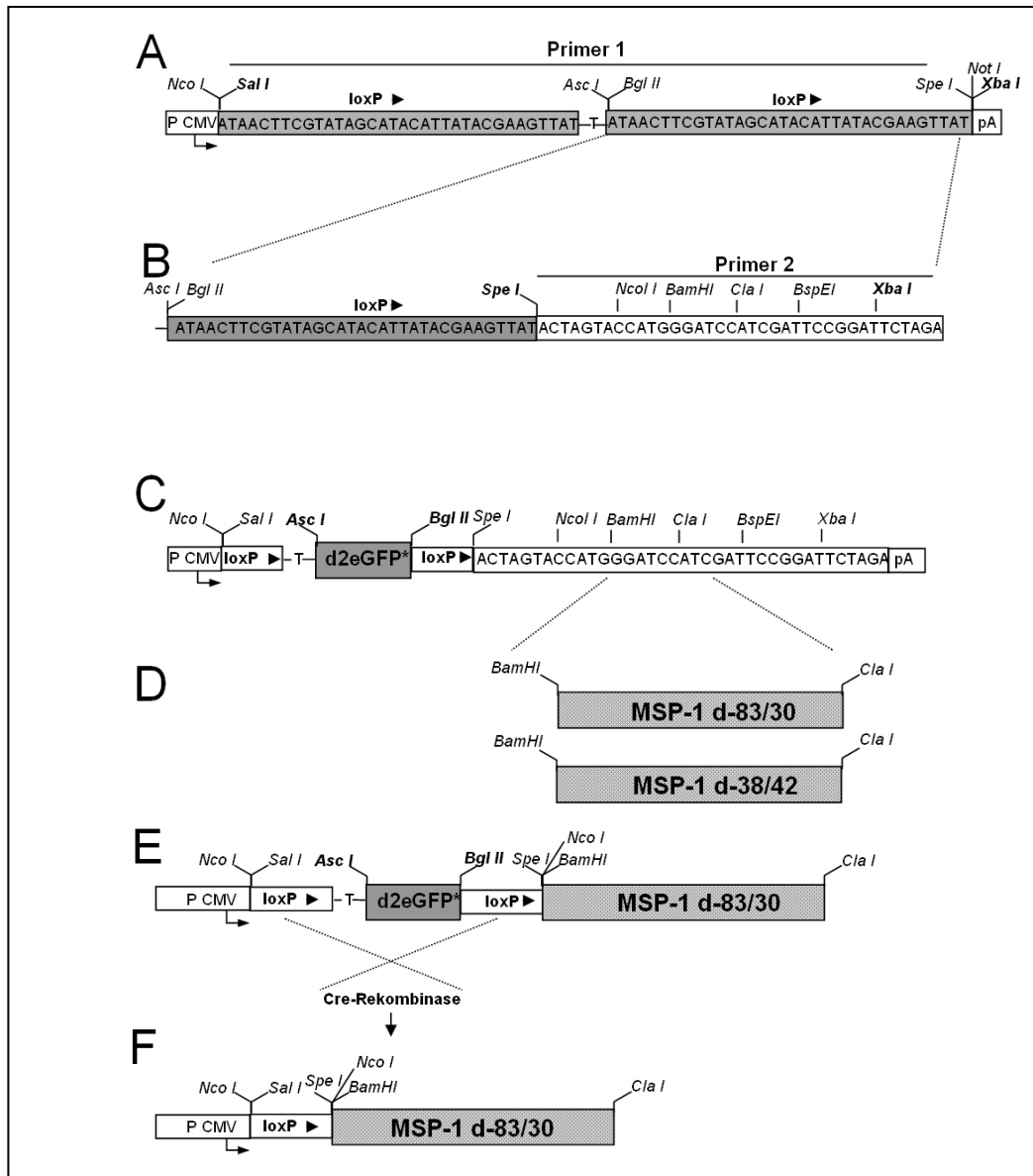


Abb. 5-10 Konstruktion der *msp-1d* Expressionsvektoren

Dargestellt sind nur die relevanten Regionen der verschiedenen Vektoren jeweils in linearer Form mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen. **A-D:** schematischer Ablauf der Klonierung von *msp-1d* Expressionsvektoren. In **A** ist der für die Konstruktion verwendete „Primer 1“ eingefügt. Er beinhaltet loxP Rekombinationssequenzen sowie mehrere Restriktionsschnittstellen. In **B** wird ein weiterer „Primer 2“ über SpeI und Xba I integriert. **C** zeigt schematisch die Integration von d2eGFP*. In **D** ist schematisch die Integration der *msp-1d* Gene dargestellt. **E** zeigt beispielhaft das d2eGFP*exprimierende End-Konstrukt mit angegliedertem d-83/30, das stabil in Hela rtTA2^sM2 transfiziert wurde. Analog wurde ein Konstrukt mit angegliedertem d-38/42 stabil in Hela rtTA2^sM2 eingebracht. **E** zeigt schematisch die homologe Rekombination durch Cre-Rekombinase in Hela rtTA2^sM2 Zellen, die zu dem in **F** dargestellten Konstrukt mit deletiertem d2eGFP* führt. Das Ergebnis der Rekombination für die d-83/30 beinhaltende Expressionskassette ist in **E** und **F** dargestellt. Die Expressionseinheit in Hela rtTA2^sM2 Zellen für d-42/38 ist entsprechend organisiert.

Stabile Transfektion und Selektion der Klone mittels iterativer FACS-Selektion

Die HRM-10 Zelllinie wurde jeweils mit beiden konstruierten *msh-1* Expressionsplasmiden über Lipofektamin-Transfektion stabil transfiziert. Dafür wurden die Vektoren vor der Transfektion mit einem Sca I Verdau linearisiert. Die HeLa Zellen wurden nach Transfektion 10 Tage lang ohne Dox kultiviert, um sicher zu sein, daß nur genomisch integrierte Expressionseinheiten analysiert werden. Anschließend wurde die GFP-Expression mit Dox induziert und einzelne Zellen durchflusszytometrisch auf GFP-Expression getestet. Positive Zellpopulationen wurden mit Hilfe von Frau Kehlenbach (ZMBH) sortiert. Die erste Selektion auf GFP-fluoreszierende Zellen nach stabiler Transfektion mit den p83/30 bzw. p38/42 Expressionskassetten ergab 0,13 % und 0,08 % positive Zellen. In jeweils drei bis vier weiteren sequentiellen FACS-Sortierungen wurden GFP positive Zellpopulationen auf 91% für die p83/30 – bzw. 76% für die p38/42 Expressionskassette angereichert. Dies lieferte die Grundlage für eine effektive Deletion von GFP durch homologe Rekombination mittels Cre-Rekombinase.

Entfernen der GFP Sequenz und Expression von MSP-1D Fragmenten p83/30 und p38/42 in HRM-10

GFP-exprimierende Zellpopulationen wurden mit dem Cre-Expressionsvektor LC-1 transient transfiziert, um die GFP flankierenden loxP Sequenzen homolog zu rekombinieren und damit GFP zu deletieren. Bei einer erfolgreichen Rekombination können die Zellen unter induzierenden Bedingungen kein GFP mehr bilden. GFP Fluoreszenz vor und nach der Transfektion der Cre-Rekombinase wurde mit FACS analysiert. GFP-negative Zellen wurden mittels FACS vereinzelt und kultiviert. Wie in Abb. 5-11 dargestellt ist die Entfernung der vorgeschalteten GFP-Sequenz mit Stopcodon notwendig für die Expression von *msh-1*. Im nächsten Schritt sollte durch Westernblot-Analysen geprüft werden, welche der Klone p83/30D oder p38/42D regulierbar exprimieren.

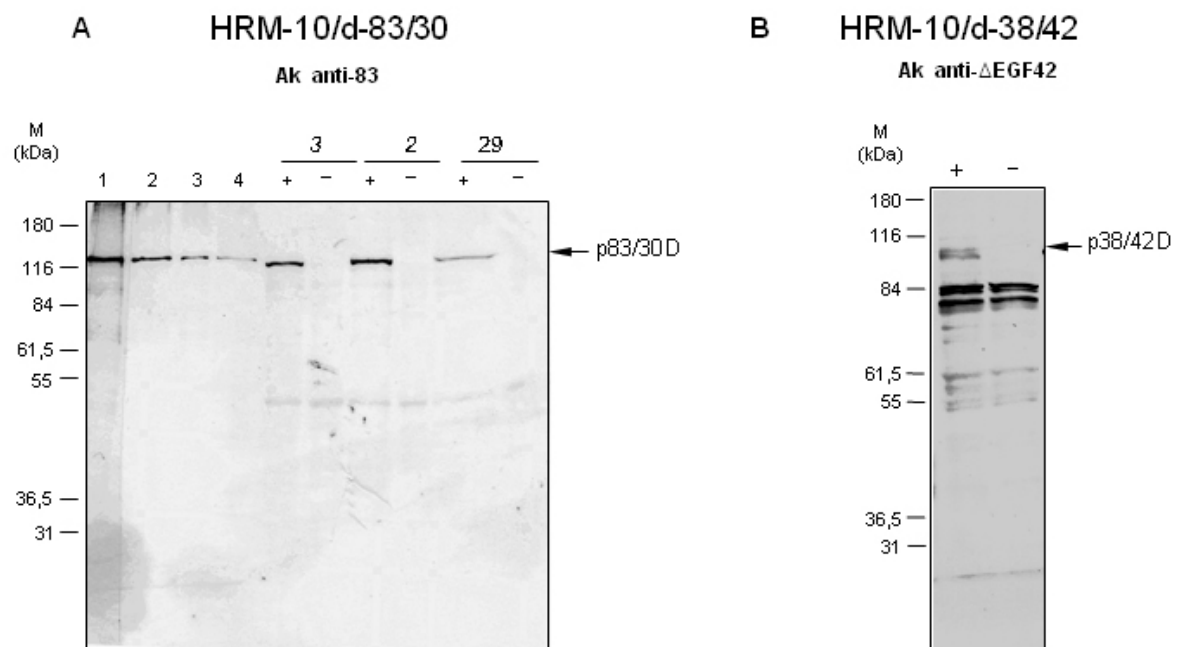


Abb. 5-11 Expressionsanalyse von HRM-10/d-83/30 und HRM-10/d-38/42 Klonen mittels Westernblot

Verschiedene HRM-10/d-83/30 und HRM-10/d-38/42 Klone wurden in 24-well Platten zu einer Konfluenz von 80% angezogen, jeweils mit (+) oder ohne (-) Doxycyclin im Medium über Nacht kultiviert und geerntet. Nach

der Aufnahme in 100ul Proteinprobenpuffer und Inkubation für 10' bei 95° wurden jeweils 10ul Gesamtzellextrakt auf 10% PAA-Gel aufgetragen und ü.N. bei 100 mA geblottet. **A-B:** HRM-10/d-83/30 und HRM-10/d-38/42 wurden +/- Dox kultiviert. p83/30D wurde in **(A)** mit anti-83 Ak detektiert. Als Mengenstandard diente aufgereinigtes p83D: 1(200 ng), 2(100 ng), 3(50 ng), 4 (25 ng). In **(B)** ist p38/42D mit anti-ΔEGF42 Ak detektiert. M, Molekulargewichtsstandard.

Herstellung einer *msp-1d* exprimierenden Zelllinie durch Selektion mittels Zeomycin (alternative Strategie)

In Zusammenarbeit mit Frau Druffel-Augustin wurde eine das gesamte *msp-1d* (p190D) exprimierende stabile Zelllinie hergestellt (s. für Übersicht MSP-1 Fragmente (Abb. 5-1). Während für die Etablierung von p83/30 und 38/42 exprimierenden HeLa Zelllinien auf GFP-Fluoreszenzsignale selektiert wurde, sollte für eine Expression von volllängen *msp-1d* ein Antibiotikum-vermittelter Selektionsdruck zu stabilen Zelllinien führen. Wie zuvor sollte *msp-1d* über einen humanen CMV-Promotor in Zellen Tetrazyklin-abhängig exprimiert werden. Hierzu wurde eine Zeomycin (Zeo)-Resistenz vermittelnde Expressionskassette zusammen mit einem *msp-1d* exprimierenden Element in HeLa-A2Db Zellen co-transfiziert. Für die Chemoselektion auf stabil positiv transfizierte Zellen wurde Zeomycin in einer Konzentration von 50ug/ml zugegeben.

Klonierungsstrategie

Zur Herstellung des *msp-1d* exprimierenden Vektors sollten die tet-Operatoren und Promotoren des pUHR1.7(36)-CL Vektors mit dem *msp-1d*-Gen des Plasmids pUHD-10/d-190.3 fusioniert werden. Das *msp-1d* enthaltende pUHD-10/d-190.3 Plasmid (Dr. Jun Miao) wurde mit Sal I geschnitten, Plasmid pUHR1.7(36)-CL mit Pst I verdaut und bei beiden überhängende Enden mit T4-Polymerase aufgefüllt. Beide linearisierten Vektoren wurden mit Sca I verdaut, so daß eine gerichtete Klonierung des *msp-1d* Fragments in pUHR1.7(36)-CL möglich war. Dadurch entstand pUHR 1.7(36)/d-*msp-1* (Abb. 5-12).

Stabile Transfektion von *msp-1d* in HRM-10

Für die Transfektion wurde pUHR1.7(36)-d-190 mit Sca I und pcDNA3.1/Zeo/CAT mit Nhe I linearisiert und in einem Verhältnis von 1:1, 1:3 1:5 mit insgesamt 5 ug DNA per Lipofektamin in HRM-10 Zellen transfiziert. Als Kontrolltransfektion diente die separat transfizierte Zeo-Kassette. Die meisten Zeo-resistenten Zellen lieferte die Transfektion mit einem Mischungsverhältnis von 1:1 (25 Klone). Insgesamt wurden 49 zeo-resistente Klone mit Kolonie-PCR auf eine gleichzeitige Integration der *msp-1d* Expressionskassette getestet: Mit den Primern d-30/forward und d-30/rev konnte nur dann ein Produkt amplifiziert werden, wenn Zeo resistente Zellen ebenfalls *msp-1d* integriert hatten. Als Negativkontrolle diente die Zelllinie HRM-10, als Positivkontrolle HRM-10/d-83/30 und Plasmid pZE 21*d-H83/30. Es konnte bei 17 zeo resistenten Klonen ein *msp-1d* spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden. Diese Klone wurden mittels Westernblot-Analyse näher charakterisiert.

Stabile regulierbare Expression von *msp-1d* in HRM-10

Um zu prüfen, welche Klone *msp-1d* unter Kontrolle von rtTA am stärksten exprimierten, wurden induzierte Klone mit zwei verschiedenen polyklonalen Antikörpern, anti-d83 und anti-dΔEGF42 (Abb. 5-1) getestet, die spezifisch MSP-1-Regionen p33 und p83 erkennen. Von 17 in der Kolonie-PCR positiven Klone exprimierten sechs das p190D Protein. Die intensivsten Signale waren bei Klonen 27, 38 und 116 zu sehen. Eine Regulation durch Tetrazyklingabe war bei Klonen 38 und 116 möglich (Abb. 5-13). Doxyzyklin führte zu einer In-

duktion der Genexpression von p190D. Ohne Doxzyzyklin war kein p190D im Westernblot nachweisbar. Die Expressionsstärke war im Vergleich zu HRM-10/d-83/30 Linien schwach, wie es bereits schon für p38/42 exprimierende Zelllinien beobachtet worden war.

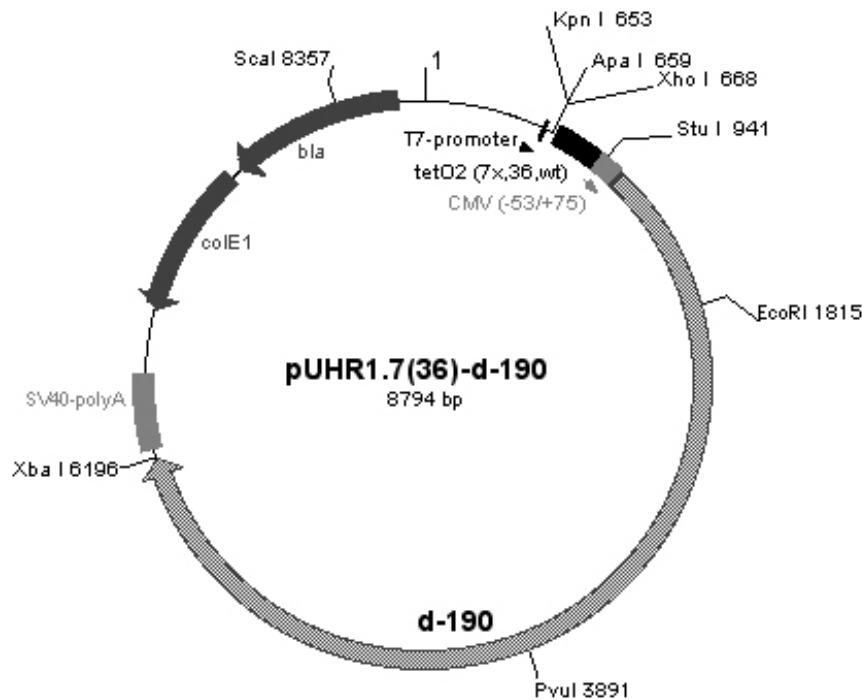


Abb. 5-12 Der Expressionvektor für *msp-1d*

Die Abb. zeigt pUHR1.7(36)-*d-msp-1*. *msp-1d* steht unter der transkriptionellen Kontrolle des Tetrazyklin-regulierbaren Promotors (Ptet). Dieser besteht aus einem CMV minimal Promotor an dessen 5'-Ende sich ein Heptamer aus Tet-Operatoren (tetO2) befindet. Zwischen den Operator Sequenzen liegen jeweils 36 Nukleotide. Das Gen trägt ein Polyadenylierungssignal der späten SV40 Gene. Zusätzlich liegt β -Lactamase (*bla*)-Gen zur Selektion auf Ampizillinresistenz und der ColE1-Replikationsursprung auf dem Plasmid. Relevante Schnittstellen sind eingezeichnet.

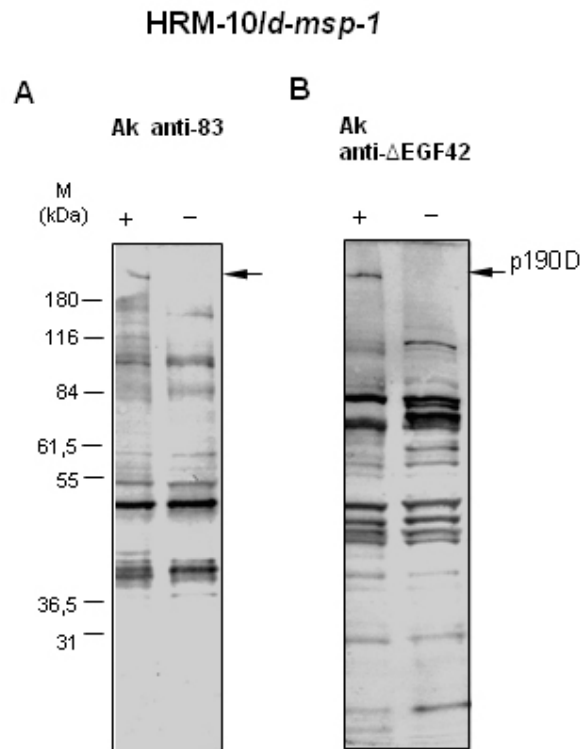


Abb. 5-13 Expressionanalyse von HRM-10/d-*msp-1* Klonen mittels Westernblot

Mit Kolonie-PCR positiv getestete Zellen wurden in 24-well Platten zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Die Klone wurden dann jeweils mit (+) und ohne (-) Dox im Medium über Nacht kultiviert und geerntet. Nach Aufnahme in 50 μ l Probenpuffer und Inkubation für 10' bei 95° wurden 10 μ l auf ein 10% PAA-Gel aufgetragen. Geblottet wurde für drei Stunden semi-trocken bei 30 V. **A-B:** HeLa-d-190 Klon 38; +/- Dox kultiviert. *msp-1d* wurde in **(A)** mit anti-d83 Antikörpern und in **(B)** mit anti-d Δ EGF42 sichtbar gemacht.

Identifikation eines von HLA-A*0201präsentierten Peptids aus p83/30D

Die im Folgenden kurz beschriebene Isolierung und Identifizierung von HLA-Rezeptor präsentierten Epitopen wurde von Priv. Doz. Dr. Stevanovic durchgeführt. Der Expressionsstatus des HLA-A*0201 Rezeptors auf HRM-10/d-83/30 Klon 3 wurde vor Extraktion der HLA-Peptid Komplexe mit einem HLA-A*0201 spezifischen Antikörper (BB7.2) überprüft und für die folgenden Experimente als ausreichend beurteilt. Um genug HLA-Peptid-Moleküle für die anschließende HPLC-Auftrennung zu erhalten, wurden $5 \cdot 10^{10}$ Zellen in Suspensionskultur angezogen. Anschließend wurden HLA-A2/Peptid Komplexe über eine Immunoaffinitätschromatographie mit HLA-A2-spezifischen Antikörpern aufgereinigt. Es folgten Säurebehandlung, Ultrafiltration und Fraktionierung mittels High-Pressure-Liquid-Chromatographie (HPLC) (Falk et al. 1991; Seeger et al. 1999). Peptid-enthaltende HPLC-Fractionen wurden vereinigt. Prinzipiell wird mit vorhergesagten Peptiden das nanokapillare HPLC-ESI-MS-System (Elektrospray-Ionisierung-Massenpektrometrie) kalibriert und anschließend die Peptidmischung der Zelllinie mit den gleichen Parametern analysiert (Predict-Calibrate-Detect (PCD) Methode)(Schirle, Keilholz et al. 2000) Vergleiche mit den Kalibrierprofilen erleichtert die Identifizierung relevanter Peptidpeaks. Erste Analysen der Peptid-Mischung zeigten die Ko-Elution eines HRM-10/d-83/30 Zelllinien-Peptids mit dem vorhergesagten MSP-1-Peptid 674 (AS: KLKEFIPKV) (Abb. 5-14). In einem zweiten Experiment konnte mit nano-

kapillarer HPLC MS/MS bestätigt werden, dass die AS-Sequenz dieses Peptids identisch mit Peptid 674. Das HLA-A*0201 restringierte physiologisch präsentierte T-Zell-Epitop 674 liegt in einem dimorphen Bereich der MSP-1 Untereinheit p83 (Abb. 5-17).

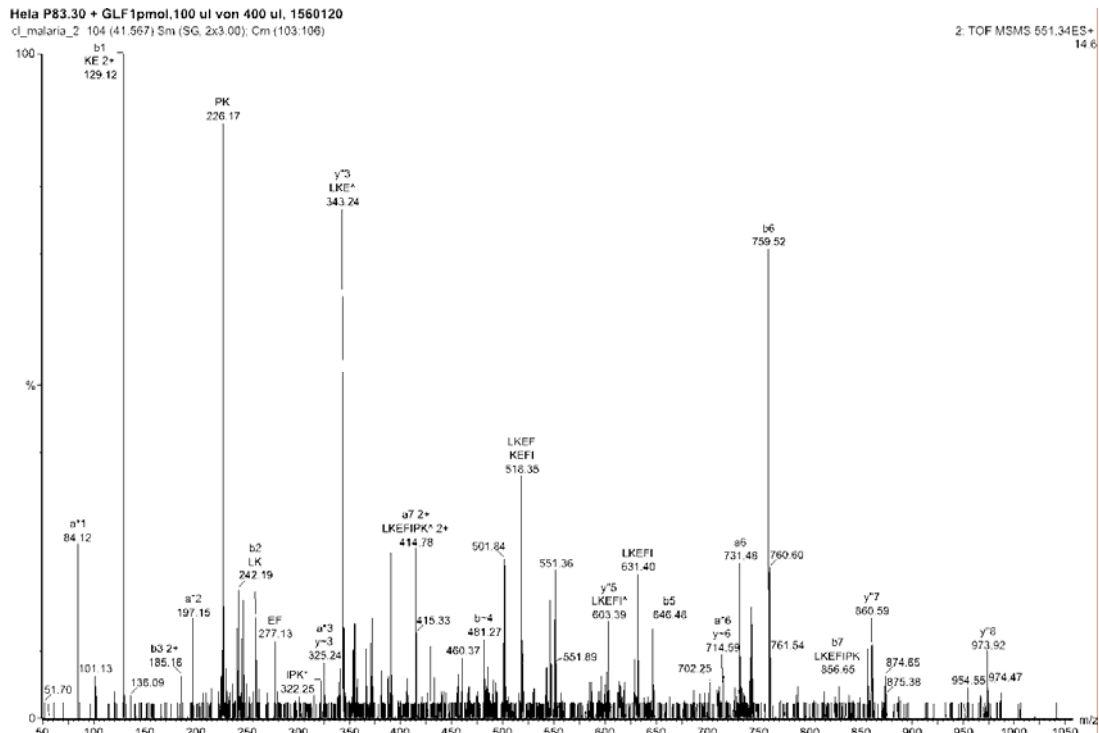


Abb. 5-14 Identifikation des vorhergesagten Peptids 674 in einer von HRM-10/d-83/30 eluierten Peptidmischung

Für ein Vergleichsspektrogramm wurden Massenchromatogramme einer Mischung synthetischer MSP-1 Peptide aufgenommen (Tabelle 5-1). Eine Mischung aus HLA-A2 gebundenen Peptiden wurde von HRM-10/d-83/30-Zelllinie extrahiert und analysiert. Diese Mischung physiologisch prozessierter und präsentierte Peptide zeigte einen Peak mit gleicher Retentionszeit wie das synthetische Peptid 674 (Daten nicht gezeigt). Dargestellt ist die durch Kollision induzierte Dissoziation und Sequenzanalyse dieses Peptids, die identisch mit der AS-Sequenz des Peptids 674 war (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Stevanovic).

5.2.2 Vorhersage von HLA-A*0201 spezifischen Epitopen in MSP-1

Für die Identifizierung von MSP-1 CD8+ T-Zell Epitopen versuchten wir zunächst durch eine *in silico* Vorhersage die Zahl der Kandidaten-Epitope einzugrenzen. Anschließend wurden diese Peptide als potentielle *in-vivo* Epitope in T-Zell-Aktivierungsexperimenten getestet.

Theoretisch ist im Proteom eines Pathogens wie *P. falciparum* eine große Anzahl von Epitopen enthalten. Nur eine kleine Zahl von Epitopen wird jedoch tatsächlich an die Major-Histokompatibilitäts-Komplex MHC-Klasse I Moleküle (beim Menschen: Humanes Leukozyten Antigen, HLA) gebunden, präsentiert und trägt dann zur Aktivierung zytotoxischer T-Zellen bei. Es wird geschätzt, daß nur eines von 2000 Peptiden, die durch Abbau eines Fremdanogens entstehen, im Zusammenhang mit entsprechend passenden HLA-Rezeptoren zu einer dominanten Immunreaktion führen (Yewdell and Bennink 1999). Eine computergestützte Vorhersage der tatsächlich bindenden Peptide kann die Anzahl der *in-vivo* zu testenden Peptide verkleinern. Mit Hilfe bereits identifizierter MHC-bindender Peptide kann die Häufigkeit bestimmter Aminosäuren in verschiedenen Positionen von gebundenen Peptiden bestimmt werden, woraus sich MHC-Allel-spezifische Sequenz-Motive ableiten lassen. Jedes HLA-Allel weist spezifische Peptid-Sequenz-Motive auf. Zum Beispiel sind Peptide, die an HLA-A*0201 binden, häufig neun Aminosäuren lang (Nonamere), und haben meist zwei Aminosäureseitengruppen, die das Peptid in der Grube des Rezeptors verankern (so genannte Anker-Seitengruppen). Im Falle von HLA-A*0201 sind diese Anker-Seitengruppen ein Lysin in Position zwei und ein Valin in Position neun (Rotzschke et al. 1992). Neben den verankern den Aminosäuren gibt es noch weitere Positionen, an denen sich bestimmte AS befinden. Eine Bewertung dieser Daten wird möglich, indem jeder AS in jeder Position, abhängig von ihrer Häufigkeit in bekannten HLA-bindenden Peptiden ein Wert („score“) gegeben wird. Eine häufig verwendete Vorhersagemethode, die auf solchen Profilen basiert, ist SYFPEITHI (Rammensee, Bachmann et al. 1999). Dieses Programm ist unter <http://www.syfpeithi.de> abgelegt. SYFPEITHI vergibt Wert 10 für häufige Aminosäuren, Wert 8 an, signifikant oft vorkommende und einen Wert von 6 an selten vorkommende Aminosäuren. In nicht-Ankerpositionen haben bevorzugte Aminosäuren Werte von 1-6 und ungünstige Aminosäuren Werte, die von -1 bis -3 reichen.

Für die Vorhersage von HLA bindenden Epitopen in *P. falciparum* MSP-1D wurden Peptide aus der SYFPEITHI Datenbank ausgewählt, die eine möglichst große Wahrscheinlichkeit hatten, mit HLA-A*0201 zu assoziieren. Peptide mit einem Bindungswert von 26 oder höher wurden chemisch synthetisiert. In Abb. 5-15 ist die Verteilung der Peptide aus dem MSP-1D dargestellt. Sie sind in den Untereinheiten p83D, p30D, p38D und p33D von MSP-1D lokalisiert, jedoch nicht in der konservierten C-terminalen Region p19D.

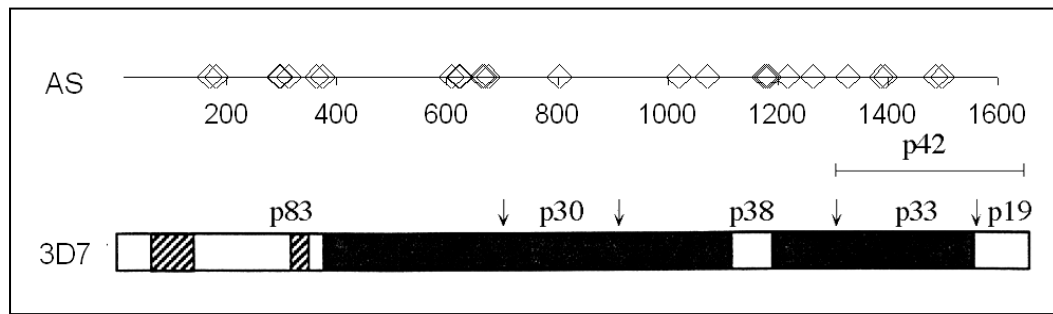


Abb. 5-15 Verteilung von vorhergesagten HLA-A*0201-bindenden Peptiden auf MSP-1D

Schematische Darstellung der Lokalisation von vorhergesagten und anschließend synthetisierten Peptiden in MSP-1D. Oben: Aminosäurepositionen der vorhergesagten Peptide. Unten: Schematische Darstellung des MSP-1D Proteins mit konservierten(weiß), dimorphen (schwarz) und oligomorphen (schraffiert) Bereichen.

Epitop	Sequenz	AS Position	Bindungsscore
169	EINELLYKL	169	26
182	DLLRAKLNDV	182	26
183	LLRAKLNDV	183	28
296	SVLEKRIDTL	296	26
297	VLEKRIDTL	297	26
313	KLLDKINEI	313	30
363	SLFTDPLEL	363	26
374	YLREKNKKV	374	26
609	SLEVSDIVKL	609	29
623	VLLIKKIEDL	623	27
624	LLIKKIEDL	624	29
664	YLIVLKKEV	664	26
667	VLKKEVDKL	667	26
674	KLKEFIPKV	674	30
804	SMDQKLLEV	804	28
131	ALNDEIKKL	1020	29
330	FLPEAKVTTV	1219	29
287	FLSSGLHHL	1176	28
291	GLHHLITEL	1180	28
374	SLLTELQQV	1263	28
183	QLESKLNSL	1072	27
294	HLITELKEV	1183	27
609	YLINLKAKI	1498	27
437	VIYLKPLAGV	1326	27
498	YIIEDSFKL	1387	26
506	LLNSEQKNTL	1395	26
597	TLYNNLVNKI	1486	26

Tabelle 5-1 HLA-A*0201 Epitope in MSP-1D

Potentielle HLA-A*0201 Epitope in MSP-1D wurden mit Hilfe der SYFPEITHI Datenbank ausgewählt. Dargestellt sind Peptide mit den höchsten Bindungswerten (≤ 26). Die Tabelle ist unterteilt in die Regionen p83/30 (weiß) und p42/38 (grau unterlegt).

ELISPOT Analyse der T-Zell-Antwort für potentiell HLA-A*0201-bindende MSP-1 Peptide

Mit einem transgenen Mausmodell konnten wir MSP-1 Epitop-spezifische CD8⁺ T-Zell Immunantworten studieren. HLA-transgene (tg) HHD-2 Mäuse (Pascolo et al. 1997) exprimieren ein Fremdgen, das aus den $\alpha 1$ (H) und $\alpha 2$ (H) Epitop-bindenden Domänen des humanen HLA-A2 besteht, fusioniert an die $\alpha 3$ -transmembran- und zytoplasmatischen Domänen des Maus Klasse-I Moleküls H-2Db(D) (Firat et al. 1999). Die humane $\alpha 1$ Domäne ist kovalent mit dem humanen $\beta 2m$ verbunden. Das Transgen wurde in Doppel-knock-out Mäuse eingebracht, in denen Maus-H-2Db und Maus- $\beta 2m$ Gene deletiert waren. HLA-A*0201 tg-Mäuse wurden mit MSP-1 immunisiert. Zur verstärkten Stimulation von zytotoxischen T-Zellen standen uns für die Immunisierungen in unserer Arbeitsgruppe entwickelte rekombinante MVA-Viren zur Verfügung, die MSP-1 produzieren (Westerfeld, Dissertation 2002 und Dr. Miao, ZMBH). Eine erfolgreiche Aktivierung MSP-1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung würde zu einer Induktion spezifischer IFN- γ -Zytokinproduktion führen. In ELISpot Assays wurden MSP-1 Peptide auf ihre Fähigkeit getestet, die Expression von IFN- γ in Milzzellen von HHD-2 Mäusen anzuregen, welche zuvor mit MSP-1 exprimierendem Vaccinia-Virus-immunisiert worden waren. Dieses Experiment wurde im Labor von Dr. Schlüter (Universitätsklinik Mannheim) durchgeführt.

Die zur Immunisierung verwendeten MVA-Viren enthielten getrennt ins Genom integriert, sowohl das Gen kodierend für die N-terminale Untereinheit 83/30 als auch die C-terminale Untereinheit 38/42 von *msh-1d*, (Westerfeld, Dissertation 2002) Zusammen repräsentieren beide integrierten MSP-1 Fragmente das gesamte MSP-1D Protein. Für ELISpot Experimente wurden Milzzellen von zwei MSP-1-MVA-immunisierten Mäusen und einer Wildtyp-MVA immunisierten Maus verwendet. Die Milzzellen wurden mit jedem der ausgewählten vorhergesagten Peptide stimuliert und IFN- γ produzierende Zellen detektiert. Eine Zusammenfassung unserer ELISpot Ergebnisse ist in Abb. 5-16 zu sehen. Von den 27 getesteten Peptiden induzierte Peptid 291 (GLHHLITEL) die stärkste IFN- γ Produktion und war damit das erste Kandidatenepitop einer gegen MSP-1 gerichteten CD8⁺ T-Zell Antwort. In dem dargestellten ELISpot Experiment stimulierte auch Peptid 609 (YLINLKAKI) signifikant spezifische zytotoxische T-Zellen. Weiterhin waren Peptide 374 (YLREKNKKV), 623 (VLLIKKIEDL) und 664 (YLIVLKKEV), die alle im p83/30-Abschnitt von MSP-1D liegen, deutlich über den Hintergrundsignalen. Unser Kooperationspartner Prof. Rammensee und Dr. Pascolo konnten in mehreren unabhängigen ELISpot Experimenten unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen Peptid 291 als vielversprechendes Epitop bestätigen. Peptide 609, 664, 623 und 374 im N-terminalen p83/30-Teil von MSP-1D waren in all ihren Experimenten schwache oder mäßig gute Stimulatoren. Eine Rolle dieser Peptide in der Aktivierung einer spezifischen T-Zell Antwort ist daher fragwürdig, und diese Peptide wurden in weiterführende Experimente nicht mit einbezogen. Zusätzlich zu Peptid 291 konnten in Tübingen auch Peptide 437 (VIYKPLAGV) und 374 (SLLTELQQV) im C-terminalen 38/42 Proteinfragment und Peptid 182 (DLLRAKLNDV) im N-terminalen 83/30 Proteinfragment von MSP-1D eine signifikante Anzahl von CD8⁺ T-Zellen zur IFN- γ Produktion anregen. Die Position aller potentiellen Kandidatenepitope im MSP-1D-Protein ist in Abb. 5-17 dargestellt. Nur Peptid 182 befindet sich in einer konservierten Region des Proteins (Block 3 von Untereinheit p83/30D). Es ist mit einem berechneten Bindungsscore von „26“ ein relativ wenig affines Epitop an HLA-A*0201, allerdings dennoch in den HHD-2 Mäusen immunogen. Die Kandi-

datenepitope 291, 374 und 437 gruppieren sich dicht um die Grenze p38–p42 in mittleren (291 und 437) bis niedrig konservierten (374) Bereichen des Proteins.

Für einige der Peptide, für die *in-silico* eine Bindung an HLA-A*0201 vorhergesagt worden war, liessen sich in MSP-1 immunisierten Mäusen nur wenige spezifischen T-Zellen detektieren. Für Peptide 374, 437, 182 und 291 konnte aber in ELISpot Experimenten eine starke IFN- γ Antwort detektiert werden, was auf Populationen aktiver MSP-1-spezifischer T-Zellen hinweist.

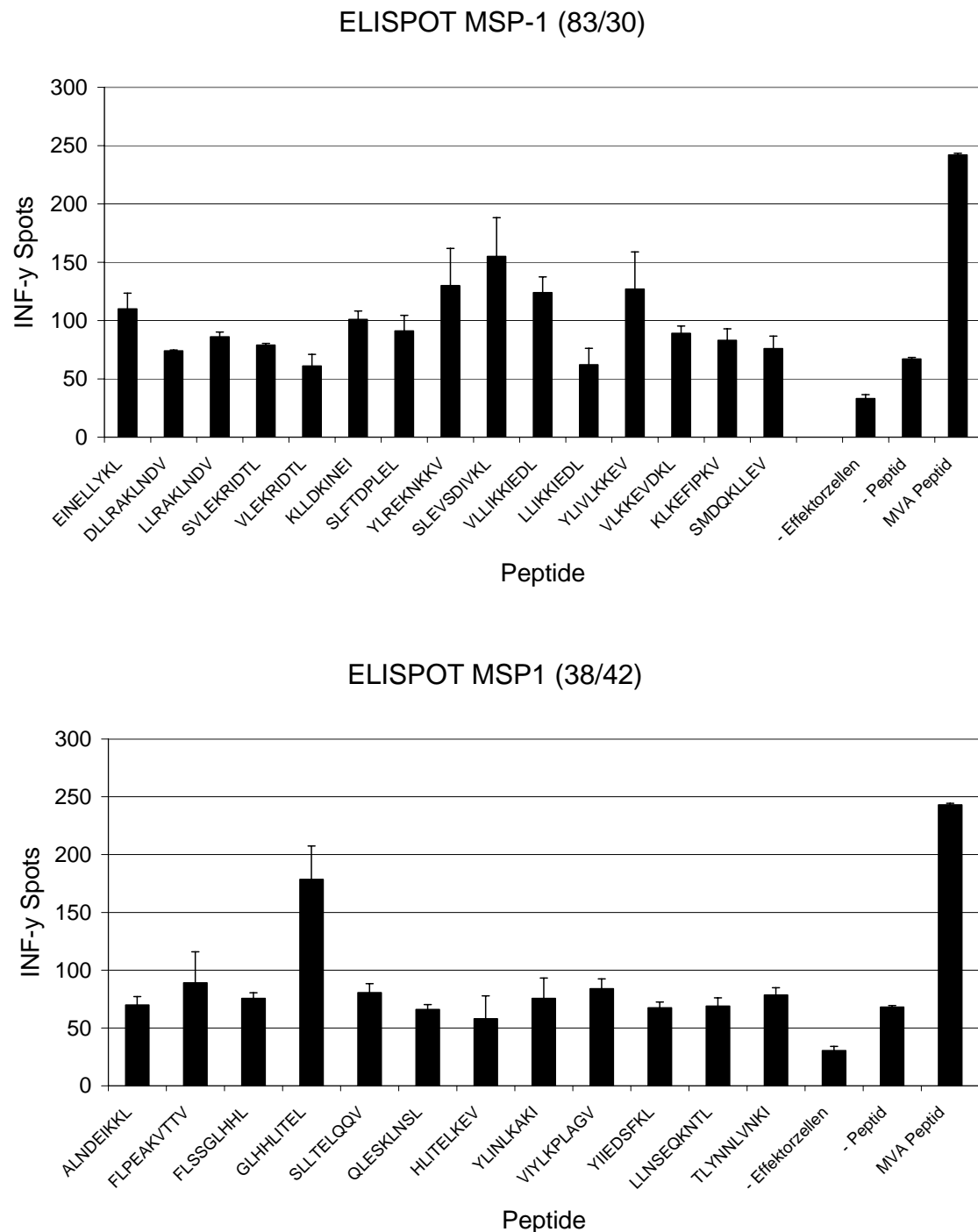
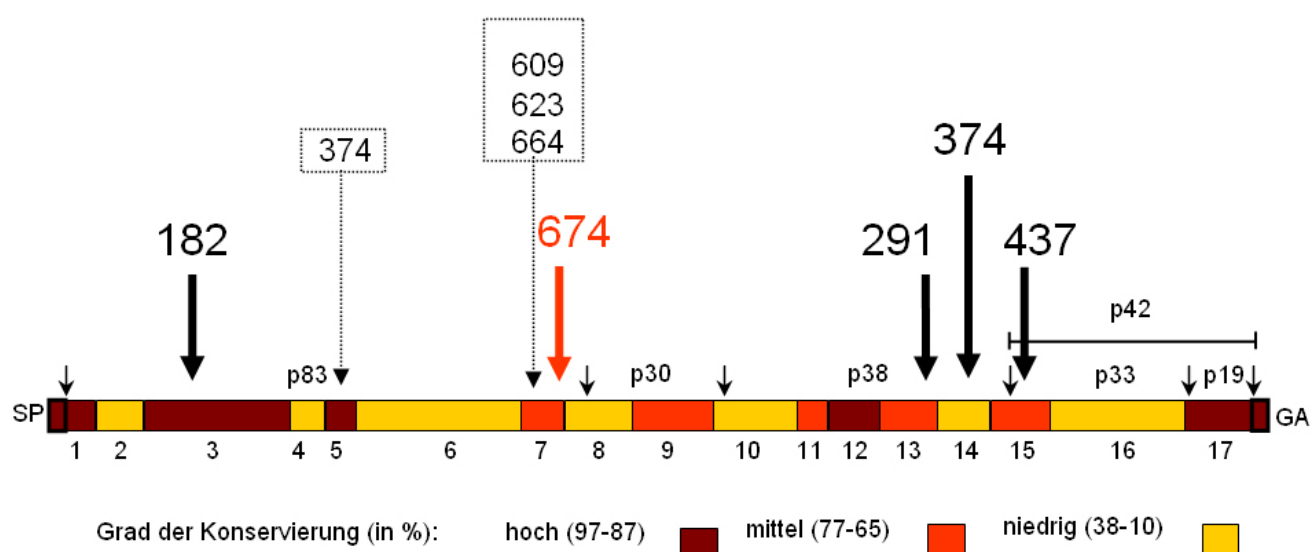


Abb. 5-16 ELISpot Assay: Die Expression von IFN- γ von Milzlymphozyten nach Peptid Stimulation

Milzzellen von zwei immunisierten Mäusen und einer nicht-immunisierten Maus wurden acht Tage nach der Immunisierung isoliert. Je 2×10^5 Milzzellen der nicht-immunisierten Maus wurden mit jedem der vorhergesagten HLA-A*0201 bindenden Peptide (10^{-6} M) inkubiert und fungierten als Antigen-präsentierende Zellen, um Milzlymphozyten der immunisierten Mäuse zu stimulieren. Die Zellen, die daraufhin IFN- γ sekretierten, wurden über IFN- γ spezifische Antikörper mittels einer Farbreaktion nachgewiesen. Positive Zellen wurden als „Spots“ detektiert und im Mikroskop ausgezählt („spot-forming-unit“, SFU). Als Positivkontrolle diente HLA-A*0201 restringiertes MVA Peptid 35-1 (SLSAYIIRV) und zur Bestimmung des Hintergrunds wurden Zellen nur mit Medium inkubiert. Von den untersuchten MSP-1 Peptiden wurde die höchste Frequenz an IFN- γ sekretierenden CD8⁺ T-Zellen für das Peptid 291 festgestellt.



candidate epitopes	
182	DLLRAKLNDV
674	KLKEFIPKV
291	GLHHLITEL
374	SLLTELQQV
437	VIYLKPLAGV

Abb. 5-17 HLA-A*0201 Epitope in MSP-1D

Dargestellt sind MSP-1D Kandidaten Epitope und ihre Position im MSP-1D-Protein. Zwei experimentelle Strategien identifizierten fünf vielversprechende MSP-1 Epitope: Kandidatenpeptide, die in MSP-1 immunisierten Mäusen mittels ELISPOT Assays die stärkste spezifische CD8⁺ T-Zell IFN- γ -Produktion induzierten, sind in Schwarz dargestellt (182, 291, 374 und 437). Peptid 182 liegt in Block 3 von MSP-1D und damit in einer stark konservierten N-terminalen Region. Peptide 291 und 374 sind in den Blöcken 13 und 14 des p38-Fragments von MSP-1 lokalisiert und liegen in mittleren bzw. niedrig konservierten Bereichen. Peptid 437 befindet sich im p42 Fragment dicht an der Grenze zur p38 Untereinheit und ist einer mittel konservierten Region im Block 15 zuzuordnen. Peptide, deren Immunogenität unklar bleibt, sind mit gestrichelten Linien gezeigt (374, 609, 623, 664): nur in einem von insgesamt vier ELIspot Assays war die Anzahl der Spots signifikant über Hintergrund. Unabhängig von der computergestützten Peptid-Vorhersage wurde Epitop 674 durch die Expression von MSP-1D in humanen Zellen identifiziert (siehe Abschnitt 5.2.1). Dieses Epitop mit seiner hohen Motivhomologie befindet sich in Untereinheit p83 im Block 7 in einer mittel konservierten Region.

5.3 Etablierung der Tetramer-Technologie zur quantitativen Erfassung epitopspezifischer T-Zellen

Jeder Mensch besitzt eine große Vielfalt an T-Zellen unterschiedlicher Antigen-spezifität, die bei zytotoxischen T-Zellen (CTL) durch die exprimierten T-Zell Rezeptoren zustanden kommt. Diese erkennen auf Zelloberflächen einen trimeren Komplex aus MHC Klasse-I Rezeptor, bestehend aus einer schweren Kette (heavy chain=hc), einer leichten Kette ($\beta 2$ -microglobulin= $\beta 2m$) und einem daran gebundenem Peptid/Epitop. Bei der MHC-Tetramer-Technologie wird dieser Komplex rekombinant hergestellt, um als Ligand CTL-Zellen mit dem passenden Antigen-spezifischen T-Zell Rezeptor zu identifizieren. Nicht jedes HLA Klasse-I Allel kann ein bestimmtes Peptid gleich gut binden. Welche Peptide/Antigene präsentiert werden, ist von dem exprimierten HLA-Allel abhängig, die sogenannte MHC I Restriktion. Unsere Untersuchungen in Mäusen und Menschen beschränken sich auf den HLA Allotyp: HLA-A*0201.

Mit MSP-1 Epitopen, die im vorigen Kapitel identifiziert wurden, sollen HLA-A*0201/Peptid Komplexe hergestellt werden, die eine quantitative Erfassung der MSP-1 spezifischen CTLs erlauben.

5.3.1 Herstellung funktioneller Tetramere

Expression der schweren Kette des HLA-A*0201 Rezeptors und des humanen $\beta 2$ -Mikroglobulin

Eine modifizierte schwere Kette des HLA-*A0201 Rezeptors (hc: heavy chain; ohne den zytoplasmatischen Bereich, siehe Material und Methoden) und die humane $\beta 2$ Mikroglobulin Kette ($\beta 2m$) wurden in *E.coli* exprimiert. Dafür wurde *E.coli* Stamm W3110-Z1 (Lutz 1995) mit den Plasmiden pET-3d (schwere Kette) und pET3a (leichte Kette) transformiert (freundlicherweise erhalten von Dr. Walter, Institut für Zellbiologie, Univ. Tübingen). Schüttelkulturen wurden mit 1mM IPTG für 3,5-4 Stunden induziert. Die schwere Kette konnte zuverlässig mit pET3d exprimiert werden Für $\beta 2m$ ergaben Expressionsanalysen in kleinem Maßstab (5ml Kulturen), daß diese nicht zuverlässig exprimiert wurde. Verschiedene Klone zeigten sehr variable Expressionsresultate, von denen einige $\beta 2m$ überhaupt nicht produzierten. Von ausgewählten $\beta 2m$ exprimierenden Klonen, die neu vereinzelt wurden, zeigten Subklone erneut ein heterogenes Expressionsverhalten.

Klonierung und rekombinante Expression der schweren und leichten Kette

Die instabile Expression der leichten Kette machte eine Umklonierung der schweren und leichten Kette in das pZ-Vektor-System nötig, das in unserem Labor sehr erfolgreich verwendet wird (Lutz and Bujard 1997). Die Transkription des inserierten Gens wird in diesem Vektor von dem Promotor $P_{A1lacO-1}$ kontrolliert und kann durch Zugabe von IPTG induziert werden. Gensequenzen der $\beta 2m$ - und schweren Kette in pET Plasmiden dienten als PCR-Matrize. An $\beta 2m$ und die schwere Kette wurden über die PCR-Primer am 5'Ende eine BamHI bzw. BglII-Schnittstelle und am 3'Ende jeweils eine XbaI-Schnittstelle eingeführt. Über diese Schnittstellen konnte das PCR-Produkt in pZE-Plasmide integriert werden. Die Klonierungen wurden von Dr. Nicole Westerfeld ausgeführt.

Leider war die Expression von $\beta 2m$ in dem pZE-Vektor sehr schwach und konnte nur im Westernblot, nicht aber mit Coomassie im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden. Kontrollsequenzierungen zeigten eine korrekte Nukleotid-Sequenz. Transformationen in BL21

pLysS *E.coli* Zellen, die auch für die Expression von pET3a und -d verwendet werden, konnten die Expression nicht verstärken. Für die Expression der β 2m Kette verwendeten wir daher den ursprünglichen pET3a Vektor, transformiert in W3110-Z1 *E.coli* Zellen. Eine Expression der β 2m Kette in diesem System konnte durch eine starke Bande im Coomassie Gel nachgewiesen werden.

Die schwere Kette konnte sowohl mit pET3d als auch mit dem pZE-Vektor in W3110-Z1 Zellen stabil überexprimiert werden. Jedoch wurde im Vergleich mit dem pET3d Plasmidsystem deutlich mehr Protein mit dem pZE Vektorsystem gebildet (Tabelle 5-2).

Die quantitative Expression der beiden Ketten erfolgte in 1,5l Schüttelkulturen. Die Aufbereitung von Einschlusskörperchen („Inclusion bodies“, IBs), in denen die Proteine der schweren und β 2m Kette hoch konzentriert waren, verringerte die Menge an kontaminierenden Proteinen bereits substantiell.

Tabelle 5-2 Ausbeuten in Einschlusskörperchen

Gesamtausbeuten an Protein aus 1,5 l <i>E. coli</i> Kulturen (mg)				
^a pZE HLA-A*0201 hc	114	102	171	109
^b pET3d HLA-A*0201 hc	50			
^c pET3a β 2m	47,5	66	51,7	59,5
HLA-A*0201 hc-S	105			
β 2m-S	49,7			

^a *E.coli* W3110-Z1 wurde mit Plasmid pZE13 hc transformiert, Expression der schweren Kette induziert und Einschlusskörperchen präpariert.

^b Plasmid pET3d war der Expressionsvektor für β 2m.

^c Plasmid pET3a war der Expressionsvektor für β 2m.

Renaturierung von HLA-A*0201/Peptid Komplexen

Alle fünf MSP-1 Kandidatenepitope (Abb. 5-18) wurden mit rekombinant hergestellter HLA-A*0201 schwerer- und β 2m-Kette zu einem Komplex gefaltet. Zusätzlich wurden als positive Kontroll-Tetramere ein bekanntes immunogenes MVA HLA-A2-Epitop (35-1) und ein immundominantes HLA-A2-Epitop (NLVPMVATV) des humanen Cytomegalovirus aus pp65 (495-503) für MVA-Immunisierungsexperimente bzw. für die Analyse von humanen CD8⁺ T-Zellpopulationen, hergestellt. Dabei wurden die denaturierten Proteine in einem als „Puls-Renaturierung“ bezeichneten Verfahren schrittweise hinzugegeben (Rudolph and Lilie 1996). Da die hc Kette zu Aggregationen neigt, wurde während der Rückfaltung eine hohe Endverdünnung (50 μ g/ml) an Protein im Renaturierungspuffer angestrebt. In drei Schritten wurden jeweils die rekombinanten Proteine hinzugegeben, wobei leichte Kette im 2,2-fachen Überschuß war. Bei der Faltungsreaktion im Renaturierungspuffer entstand ein Präzipitat, das durch Zentrifugation beseitigt wurde. Der Renaturierungsansatz wurde anschließend ankonzentriert und erneut von Präzipitat befreit.

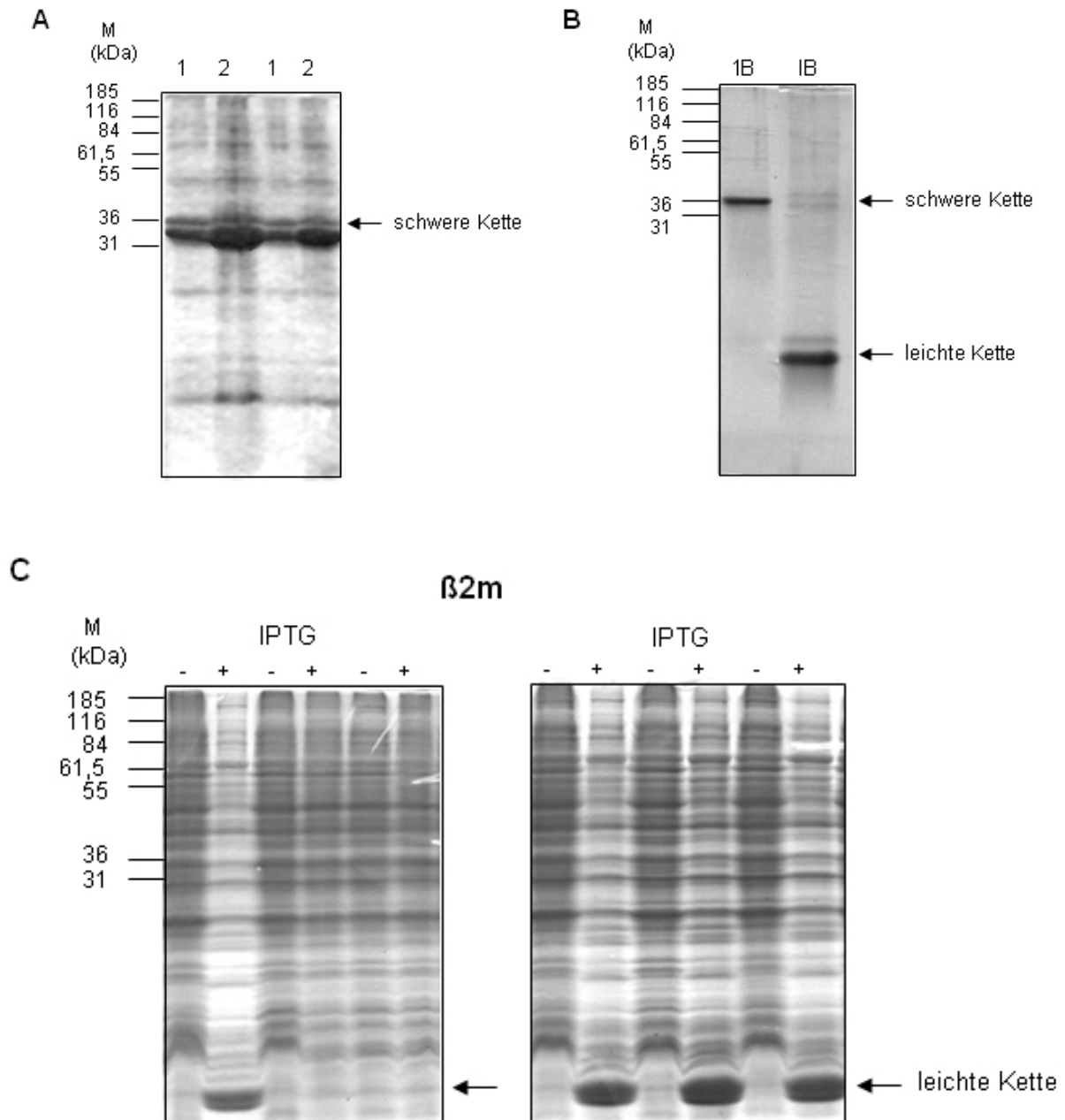


Abb. 5-18: Elektrophoretische Analyse von in *E.coli* exprimierter HLA-A*0201 schwerer Kette und leichter Kette

A: *E.coli* W3110-Z1 wurde mit HLA-A*0201 schwere Kette entweder in pET-3d (1) oder einem Plasmid des pZE-Systems (2) transformiert und bei 37°C kultiviert. Bei OD600 0,5-0,7 wurde durch Zugabe von IPTG(+) die Expression für 3,5 Stunden induziert. (-): keine Zugabe von IPTG. Solubilisierter Einschlusskörperchen wurden 1:10 mit 6M Harnstoff verdünnt, gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. **B:** Expression der schweren Kette aus pZE- und der leichten Kette aus pET3a. Aufgetragen sind schwere und leichte Kette aus aufbereiteten Einschlusskörperchen. **C:** Einzelne Sub-Klone von pET-3a ($\beta 2m$)-Vektor transformierten *E.coli* W3110-Z1, die mit IPTG (+) induziert wurden. Gelelektrophoretische Auftrennung von Gesamtzellextrakten von *E.coli* W3110-Z1 zeigte, daß die Expression von $\beta 2m$ nicht bei allen Subklonen zu beobachten war. 15% PAA-Gel, 0,1% SDS. M: Molekulargewichtsstandard.

Aufreinigungsverlauf

Mit dem Tetramer-Konzentrat wurden nun zwei unterschiedliche Vorgehensweisen erprobt. Entweder das Konzentrat wurde direkt in PBS umgepuffert und biotinyliert (Methode 1). Diese Methode erforderte bis zum biotinylierten Monomer nur eine chromatographische Aufreinigung durch Gelfiltration. Eine zweite Vorgehensweise war die Aufreinigung der gebildeten konzentrierten Komplexe über Gelfiltrationschromatographie vor der Biotinylierung (Methode 2). Zwischen beiden Methoden gab es große Unterschiede in der Ausbeute von biotinyliertem Monomerkomplex. Die Menge an aufgereinigtem biotinyliertem Komplex betrug je nach Methode und Peptid 0,7-7.7% des eingesetzten Proteins. Durchschnittlich erhöhte die Umpufferung in PBS und sofortige Biotinylierung die Menge an biotinylierten Monomer um das 7-10fache. Vergleiche der Elutionprofile der ersten Gelfiltration von Methode 2 und Methode 1 zeigten ähnliche Mengen des Tetramer-Komplex-Peaks. Erst nach der zweiten Säulenchromatographie sank die Ausbeute an Komplex dramatisch, wahrscheinlich durch unspezifische Verluste an die Säulenmatrix.

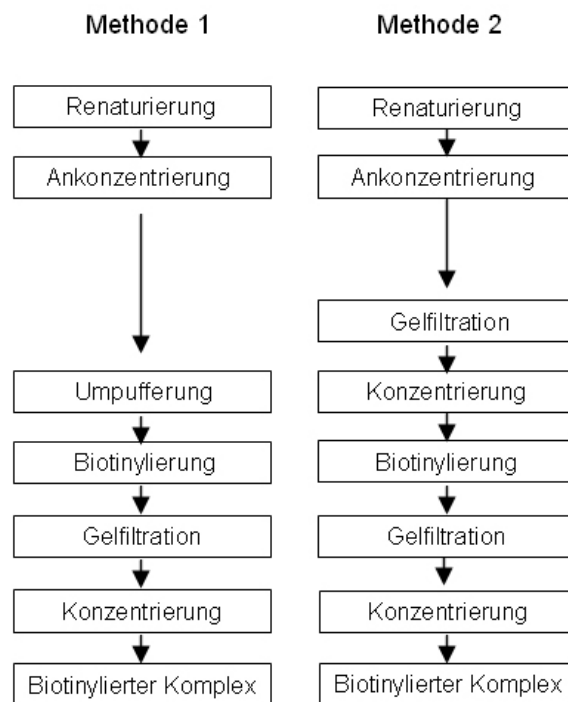


Abb. 5-19 Aufreinigungsverlauf nach Methode 1 und 2

Flußdiagramm mit den einzelnen Schritten zur Herstellung von HLA-A*0201/Peptid-Monomeren. Methode 1 und 2 unterscheiden sich im Ablauf grundsätzlich durch die Anzahl erforderlicher Gelfiltrationschromatographien und durch die Position des Biotinylierungsschritts innerhalb des Ablaufs.

Während des Rückfaltungsprozesses wurde durch Präzipitation und die Biotinylierungsreaktion am meisten Protein verloren. Dagegen präzipitierte während der Ankonzentrierung des Faltungsansatzes nur wenig Protein. Die Umpufferung in PBS führte zu erneuten Verlusten durch Präzipitation. Am Ende der Biotinylierung waren durchschnittlich noch 50% des in die Enzymreaktion eingesetzten Proteins vorhanden.

Vergleicht man die Ausbeuten an biotinylierten Monomeren, die mit Methode 1 aufgereinigt wurden, lieferte Peptid 674 die höchste Ausbeute mit 600µg. Peptid 674 hatte zugleich auch in den Computer-gestützten Vorhersagen von allen MSP-1 Peptiden den höchsten vor-

hergesagten HLA-A*0201-Bindungswert. Während der Renaturierung präzipitierte umso mehr Protein, je niedriger der vorhergesagte Bindungswert war (Tabelle 5-2). Die größte Menge an präzipitiertem Material wurde im Renaturierungsansatz mit Peptid 182 (Bindungswert 26) und Peptid MVA beobachtet. Die Ausbeute von biotinyliertem Komplex war sehr gering, und zudem war der aufgereinigte Komplex nicht stabil: In der gelelektrophoretischen Auftrennung des 182-Monomer-Komplexes konnte keine schwere Kette nachgewiesen werden, da sie wahrscheinlich nach der Dissoziation des Komplexes ausfällt. Um eine stabilere Bindung an das HLA-A*0201 Molekül zu erreichen, wurde die Aminosäuresequenz des 182 Peptids modifiziert, um den vorhergesagten Bindungswert zu erhöhen. Die erste Aminosäure eines Peptids kann mit Tyrosin substituiert werden, ohne die Antigenspezifität zu verändern. Jedoch bewirkt die Änderung der AS-Sequenz eine erhöhte Affinität für den HLA-A*0201 Rezeptor (Tourdot et al. 2000). Die erste Aminosäure des 182 wurde durch ein Tyrosin ersetzt (=182/y). Für eine Verkürzung des Peptids 182 errechnete SYFPEITHI ebenfalls einen erhöhten Bindungswert (=182/9). Mit diesen beiden neu-synthetisierten Peptiden konnten stabile biotinylierte Komplexe hergestellt werden.

Elutionsprofile der Gelfiltrationschromatographien waren bei allen Rückfaltungsexperimenten mit verschiedenen Peptiden ähnlich (Abb. 5-20). Zunächst erschien bei 40 ml Ausschlussvolumen der Säule ein Detektionsmaximum („Peak“), das vor allem Aggregate der schweren Kette enthielt. Obwohl die schwere Kette immer aggregierte, war diese Aggregation bei Methode 1 deutlich geringer als bei Methode 2. Bei Umpufferung des Renaturierungsansatzes scheinen selektiv Protein-Aggregate der schweren Kette auszufallen, die durch Zentrifugation beseitigt werden können. Als nächstes wurde der Peptid-HLA-A*0201-Komplex-Peak/Monomer-Peak bei 60 ml Ausschlussvolumen eluiert. Dieser Komplex ist bei Rückfaltungsversuchen ohne Peptid nicht zu erkennen. Zwischen Aggregate-Peak und Komplex-Peak kann, wie bei Peptid 437 (Abb. 5-20) ein weiterer Peak erscheinen, der kleinere Aggregate und eventuell freie schwere Kette enthält. Bei 80 ml Ausschlussvolumen wurde die freie leichte Kette eluiert. Bei Gelfiltrationen nach der Biotinylierung eluierte später noch ein sehr hoher Peak, der vermutlich Peptid enthält. Anschließend folgten einige Peaks, die wahrscheinlich niedermolekulare Substanzen enthielten.

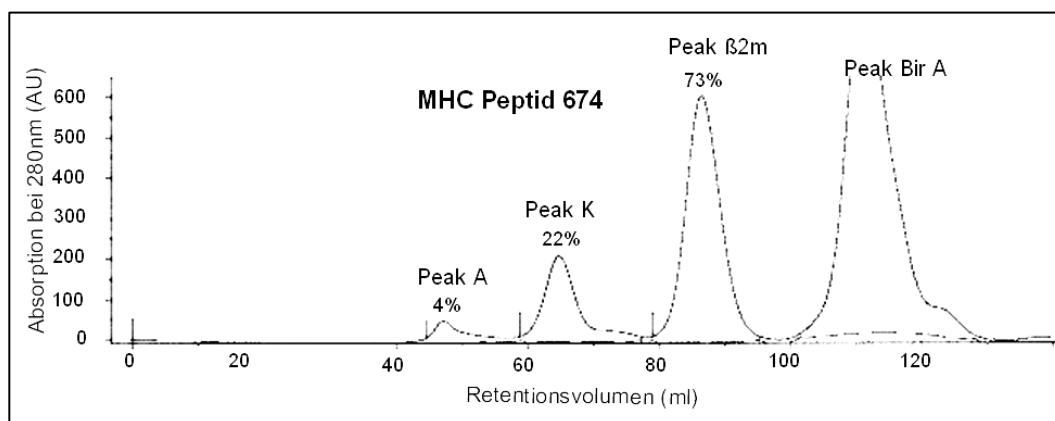


Abb. 5-20 Beispielhaftes Elutionsprofil einer Gelfiltrationschromatographie von renaturierten, biotinylierten HLA-A*0201/MSP-1-Peptid Komplexen

MSP-1 Peptid 674 wurde mit HLA-A*0201 renaturiert. Renaturierungsansatz wurde auf Gelfiltrations-Säulenmatrix Sup 75 geladen. Dargestellt ist das Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatographie. Während der Elution wurde die Proteinkonzentration mittels Lichtabsorption bei 280 nm gemessen. Die Größe der Absorptionsmaxima (nur Flächen über der gestrichelten Basislinie) in Prozent (%) relativ zur Gesamtfläche aller Peaks wurde berechnet. Für die Auswertung wurde „Unicorn 3.21“-Software verwendet (Amersham Bioscience). A = Aggre-

gate-Peak; K = Komplex-Peak; β 2m = leichte Kette-Peak; Bir A = Biotinylierungsenzym-Peak; Peptid: Peptid-Peak

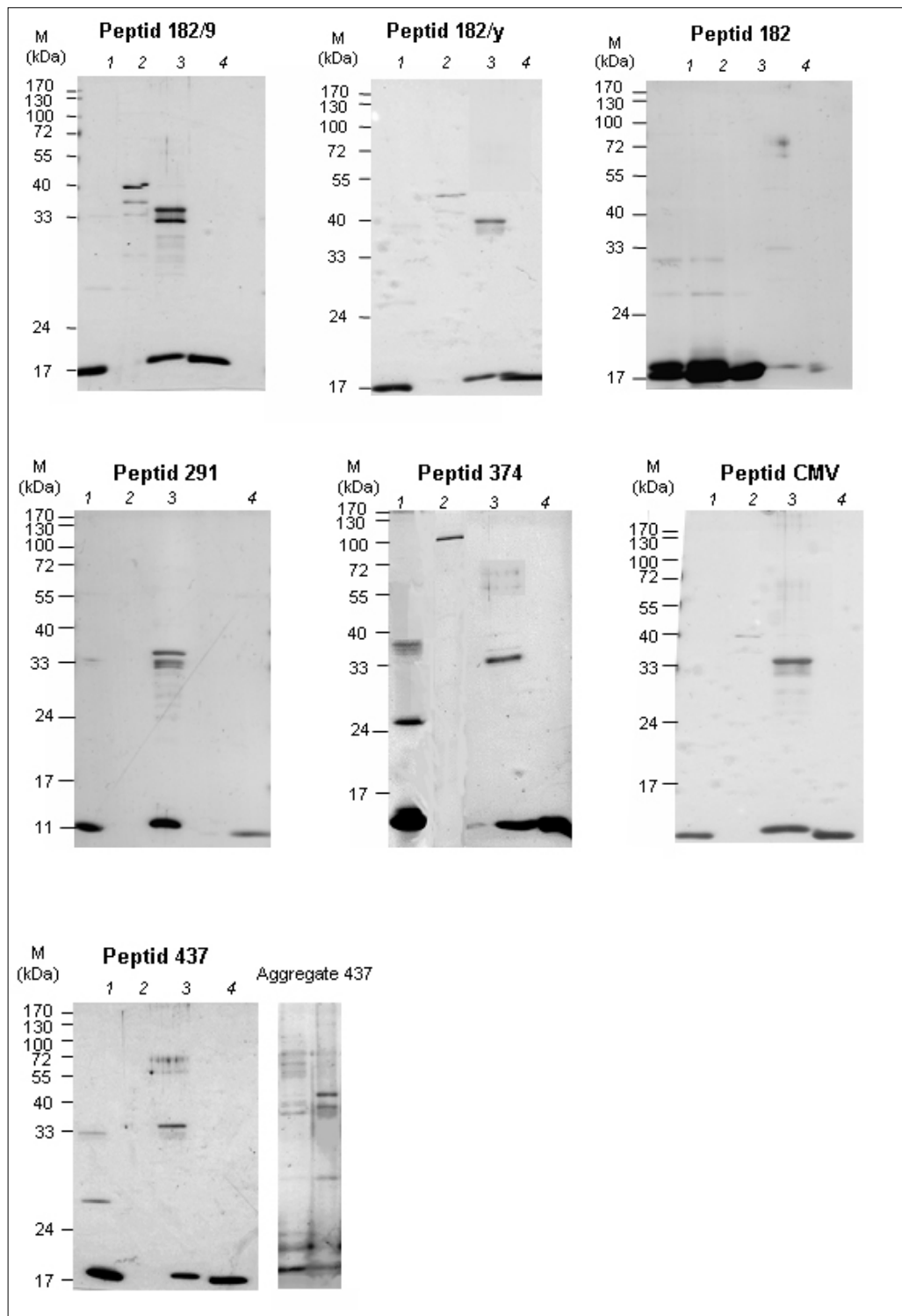


Abb. 5-21 Gelelektrophoretische Analyse der Gelfiltrationschromatographie

Renaturierungsansatz mit trimerem Komplex aus schwerer Kette HLA-A*201, leichter Kette und dem jeweiligen Peptid wurde über Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Eluierte Peaks wurden auf ein PAA Gel aufgetragen: Die Spuren enthalten: 1: Auftrag, 2: Aggregate-Peak, 3: Komplex-Peak, 4: leichte Kette-Peak. Gelelektrophorese wurde bis auf den Komplex-Peak unter nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Der Kom-

plex-Peak wurde ankonzentriert, reduziert und 0,3-0,6 µg aufgetragen. Proteine wurden durch Silberfärbung von 15% PAA Gelen sichtbar gemacht.

Biotinylierungsnachweis mittels Gelshift-Assay

Es ist wichtig, die Effizienz der Biotinylierung von Peptid-HLA-A*0201-Monomeren zu überprüfen, da Qualität und Funktionalität der Tetramer-Reagenzien davon abhängen. Prinzipiell wird in diesem Assay Biotin an der schweren Kette mittels Streptavidin nachgewiesen. Diese Interaktion bleibt selbst unter Bedingungen der Protein-Gelelektrophorese bestehen und kann durch einen „shift“ der schweren Kette auf Höhe größerer Markerproteine nachgewiesen werden (Abb. 5-22).

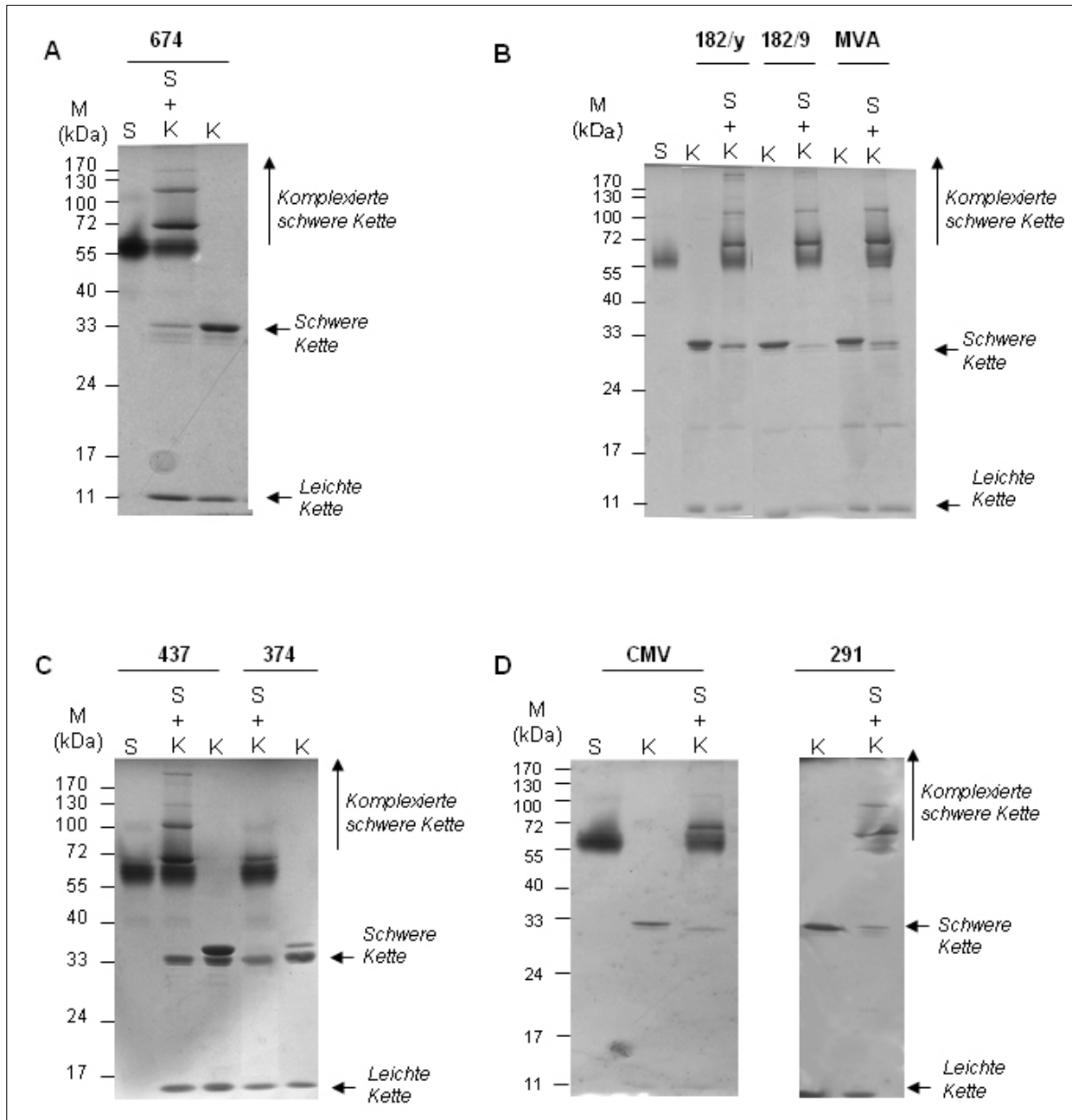


Abb. 5-22 A-D: Gelshift-Assay zum Nachweis der in vitro Biotinylierung von verschiedenen Peptid-HLA-A*0201 Monomer Komplexe

Biotinylierte aufgereinigte und ankonzentrierte Peptid-HLA-A*0201 Monomere (2-4 µg) wurden mit (+) oder ohne (-) Streptavidin inkubiert. Streptavidin alleine ist jeweils in der linken Spalte der Gele A-D aufgetragen.

Unter den Bedingungen der Gelelektrophorese zerfällt der Peptid-HLA- A*0201 Komplex in schwere und leichte Kette. Die biotinylierte schwere Kette bindet an Streptavidin. Streptavidin kann bis zu 4 Biotinylierte schwere Ketten binden. Deswegen beobachtet man mehrere Banden, die durch die unterschiedliche Größe der Streptavidin-schwere Kette Komplexe entstehen („geshiftete Banden“). Die Gelelektrophorese wurde unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt (A-D 12% PAA) und Proteine durch Coomassie Färbung sichtbar gemacht.

5.3.2 Identifizierung MSP-1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramer-Anfärbung

Induktion von MSP-1-Epitop-spezifischen T-Zellen durch Immunisierung von HHD Mäusen

Massenspektrometrie und ELISpot Experimente identifizierten fünf MSP-1D spezifische Epitope, die an HLA-*A0201 Rezeptoren gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden und so Peptid-reaktive CD8⁺ T-Zellen stimulieren können. In ersten Immunisierungsexperimenten von HHD-2 Mäusen wurden immunostimulatorische Eigenschaften dieser fünf Kandidatenepitope charakterisiert. Die Ergebnisse der HHD-2 Mäuseexperimente sollten zum Einen auf eventuelle immunodominante MSP-1 Epitope hinweisen. Ein zweites Ziel war die Optimierung verschiedener Immunisierungsprotokolle, die zu einer möglichst starken Expansion MSP-1-spezifischer T-Zellen führen sollten. Beide Faktoren, sowohl die Detektion eventueller immunodominanter Epitope als auch die Analyse von Immunisierungsabläufen, ist für die strategische Entwicklung eines Malaria-Impfstoffes in unserem Labor von Interesse.

Mittels Tetramer-Technologie konnte nach Immunisierungen die ex-vivo Häufigkeit von MSP-1 Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen verfolgt und verglichen werden. Da Tetramer-Anfärbungen quantitative Informationen liefern und keine Aussagen über die Qualität der identifizierten T-Zellen erlauben, wurden auch intrazelluläre IFN- γ Färbungen vorgenommen. Auf diese Weise konnte die Funktionalität Epitop-bindender T-Zellen überprüft werden.

Immunisierung von HHD Mäusen mit MSP-1 sekretierend exprimierendem MVA

Für die Einfach-Immunisierung von HHD-2 transgenen Mäusen wurden MVA-Viren, die das Gesamtgen *mvp-1d* exprimieren, intra-muskulär gespritzt. Da die Mäuse für ELISpot Experimente bereits erfolgreich mit rekombinantem MVA geimpft worden waren, erwarteten wir eine hinreichende Expansion MSP-1D-spezifischer CD8⁺ T-Zellen für die anschließende Identifikation von spezifischen T-Zell Populationen mittels Tetramerfärbungen. Als Kontrolle für eine erfolgreiche MVA-Immunisierung dienten Tetramerfärbungen mit einem MVA-spezifischen Epitop, VP-35#1 (Drexler et al. 2003). In dem dargestellten Experiment wurden zwei Mäuse mit *mvp-1d* exprimierendem MVA geimpft und Peptid 291 spezifische T-Zellen gemessen.

Die Einfach-Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem MVA expandierte die Gesamt-CD8⁺ T-Zell Population von 3-4% auf 8%. Bei allen Anfärbungen mit Tetramer-Reagenzien war eine starke Markierung von nicht-CD8⁺ Zellen zu erkennen. Da B-Zellen, Natürliche-Killer-T-Zellen und Myeloide Zellen ebenfalls Rezeptoren aufweisen, die HLA-Klasse-I Moleküle erkennen und auf diese Weise HLA/Peptid-Tetramere binden können, ist diese Anfärbung mit HLA-Klasse I spezifischen Tetrameren zu erklären. Es handelt sich also vermutlich nicht um unspezifische Anfärbungen (Lopez-Botet et al. 2000; Borrego et al. 2002). In beiden MVA-immunisierten Mäusen wurden signifikante Populationen von Epitop 291 spezifischen CD8⁺ T-Zellen und von MVA-Epitop VP-35#1 spezifischen CD8⁺ T-Zellen gemessen (Abb. 5-23 Durchflusszytometrische Analyse MSP-1-Epitop-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Einfach-Immunisierung von HHD-2 Mäusen mit rekombinantem MVA).

Allerdings waren in einer Maus im Verhältnis mehr MVA-Epitop-positive CD8⁺ T-Zellen zu detektieren als 291 positive CD8⁺ T-Zellen. In der zweiten Maus detektierten wir annähernd gleich viele Epitop-spezifische T-Zellen für Epitop 291 und VP-35#1. Die Anzahl identifizierter T-Zellen war bei beiden Mäusen relativ niedrig. Peptid VP-35#1- und Epitop 291-spezifische CD8⁺ T-Zellen machten 0,2-0,8% bzw. 0,15-0,3% der Gesamt-CD8⁺ Zellpopulation aus. Das Ergebnis veranlaßte uns, eine andere Immunisierungsstrategie auszutesten.

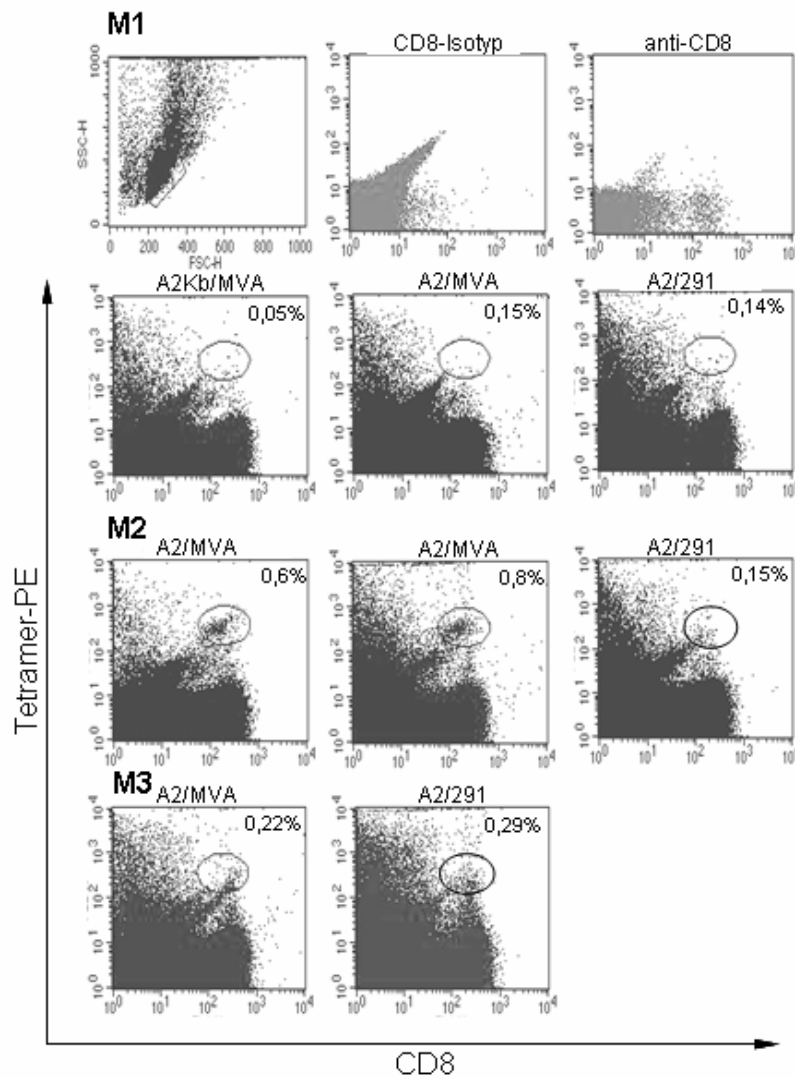


Abb. 5-23 Durchflusszytometrische Analyse MSP-1-Epitop-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Einfach-Immunisierung von HHD-2 Mäusen mit rekombinantem MVA

Insgesamt wurden vier Mäuse immunisiert: Zwei Mäuse (M2 und M3) erhielten eine intramuskuläre Injektion von 5×10^6 rekombinantem MVA. Zwei Mäuse dienten als Kontrolle und wurden mit 5×10^6 Wild-Typ MVA immunisiert. Eine Kontrollmaus starb. Am siebten Tag nach Immunisierung wurden die Mäuse getötet, die Milzen entnommen und analysiert. **A** zeigt Subpopulationen der Milzlymphozyten einer nicht-immunisierten HHD-2 Maus. Gezählt wurden alle Lymphozyten in Auswahl 1 (Gate R1). In den nachfolgenden Experimenten wurde CD8-Rezeptor mit anti-CD8a- Ak-FITC und als Kontrolle der Ak-Spezifität mit dem Ak-Idiotyp des anti CD8a Antikörpers (FITC-konjugiert) markiert. Als Kontrolle der Spezifität der Tetramerfärbungen (A2 = HLA-A*0201) wurde jeweils eine Färbung mit A2/MVA und A2/291 + anti-CD8a durchgeführt (Plots in der zweiten Reihe). Zusätzlich wurde eine Färbung mit chimärem A2/MVA Tetramer durchgeführt (A2/Kb MVA)(s. Diskussion). In **B** sind untereinander Ergebnisse von zwei mit MSP-1 immunisierten Mäusen (M1 und M2) angeordnet. Milzlymphozyten wurden mit anti-CD8a-FITC Antikörper und den jeweiligen MSP-1-Peptid/PE-konjugier-

ten Tetrameren (A2/X) behandelt. Die verwendeten A2/Peptid Komplexe stehen jeweils über den Plots. Angegeben ist die relative Zellzahl im jeweiligen oberen rechten Quadranten in Prozent der CD8+ markierten Zellpopulation.

Heterologe Immunisierung von HHD-2 Mäusen mit *msp-1d* exprimierenden Vektoren

Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß einige der erfolgreichsten Impfstrategien für eine Induktion von Epitop-spezifischen CD8+ T-Zellen heterologe prime-boost Protokolle sind. In diesen Protokollen wird mit unterschiedlichen Vektoren sequenziell geimpft, die das gleiche rekombinante Antigen exprimieren. Dadurch wird die T-Zell Antwort auf Peptide des rekombinanten Antigens fokussiert, da nur diese T-Zell Epitope den eingesetzten Impfungen gemeinsam sind (Ramshaw and Ramsay 2000). Priming mit Plasmid-DNA und „Boosting“ mit rekombinantem MVA führen in vielen Beispielen zu einer starken CD8+ T-Zell Reaktion (Kent et al. 1998; Schneider et al. 1998; Amara et al. 2001).

Die von uns durchgeführten heterologen Immunisierungen wurden mit *msp-1d* kodierender Plasmid-DNA (pUHD10-d190.3) und rekombinantem MSP-1D (p190D) exprimierendem MVA (s. oben) durchgeführt. Leider konnten in diesem Experiment nur drei Mäuse eingesetzt werden, da es Vermehrungsschwierigkeiten mit den HHD Mäusen gab. Diese Prime-Boost Protokolle führten zu einer breit gefächerten T-Zellantwort gegen die gemessenen MSP-1 Epitope, die stärker ausfiel als bei einer Einfach-Immunisierung mit rekombinantem MVA (Abb. 5-24). Epitop-spezifische T-Zellen konnten in diesem Experiment für die MSP-Peptide 182, 182-9, 291 374 und für 674 identifiziert werden. Die größten T-Zell Populationen wurden für 674 und 374 gemessen. Für das MVA-Epitop VP-35#1 spezifische T-Zellen konnten im Vergleich mit der Kontrollmaus (M1) nicht eindeutig identifiziert werden. Bei einer der mit MSP-1-MVA geimpften Mäuse (M3) lag der Anteil der gesamten CD8+ T-Zell Population nach Immunisierung bei unter 2% beobachten. Dies könnte auf apoptotischen Prozesse bei CD8+ T-Zellen hinweisen, die durch eine zu hohe Antigen-Dosis verursacht werden können (Welsh 2001). Gleichzeitig wurden in dieser Maus MSP-1-spezifische T-Zell Populationen von 6,7% (Epitop 374) und 4,4% (Epitop 291) gemessen. Ebenfalls in dieser Maus bewegten sich im Vergleich zu Maus M2 die Tetramer-markierten CD8+ T-Zellpopulationen weiter nach rechts, hatten also einen geringeren CD8+-Anteil. Unterschiede in der CD8-Rezeptordichte auf den Zelloberflächen könnten auf Unterschiede des Aktivierungszustands der CD8+ T-Zellen hinweisen. Eine starke Aktivierung führt zu einer Runterregulierung von CD8-Rezeptoren. Aus dem beschriebenen Grund war es schwierig, eine Detektionsauswahl („Gating“) zu finden, das möglichst nur Tetramer+-CD8+ Zellen einschloß.

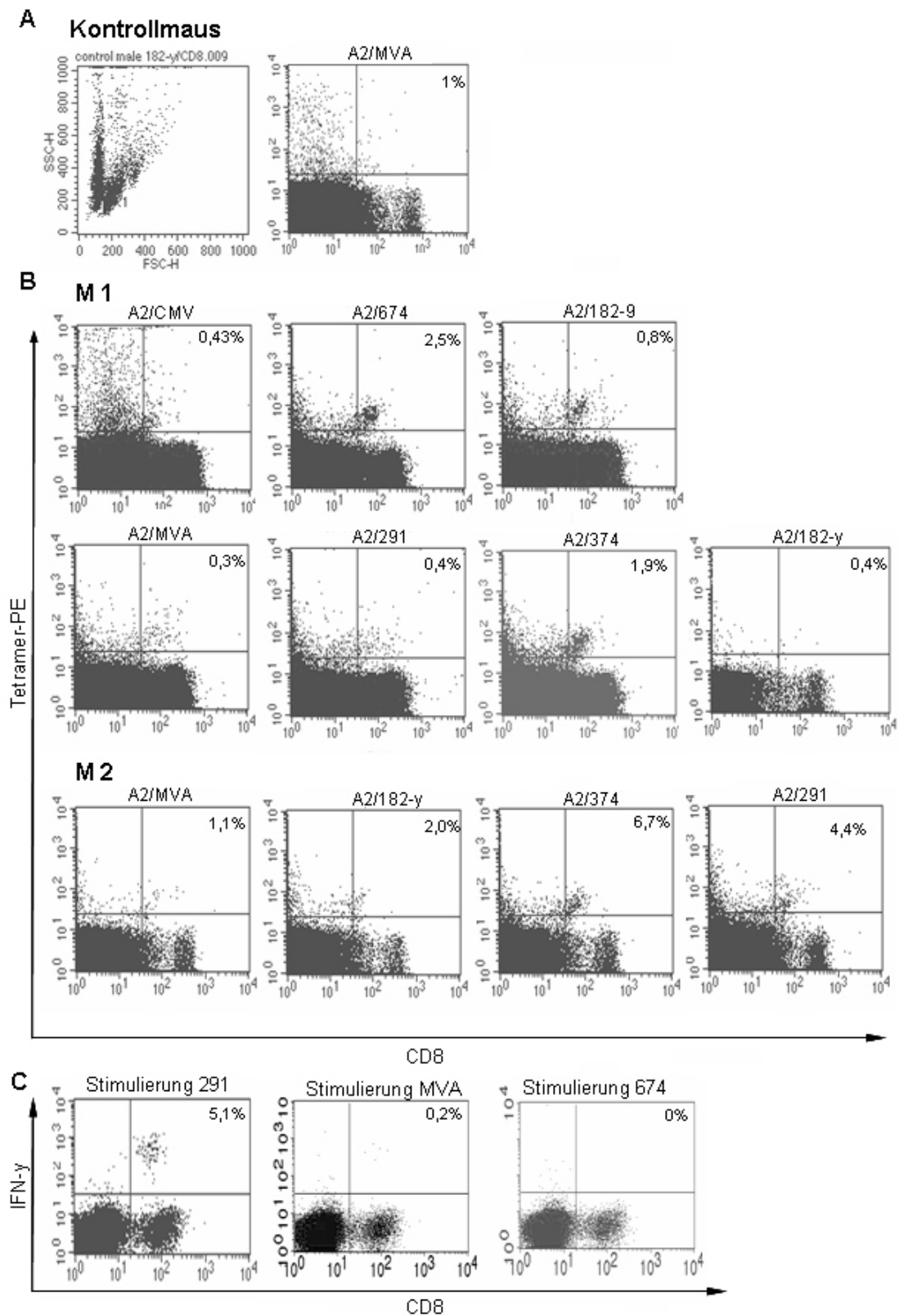


Abb. 5-24 Durchflusszytometrische Analyse MSP-1-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach heterologer Immunisierung von HHD-2 Mäusen

Insgesamt wurden zwei Mäuse mit *msp-1d* kodierender Plasmid-DNA und *msp-1d* exprimierendem MVA immunisiert. Die primäre Induktion der CD8⁺ T-Zellen erfolgte mit 200µg *msp-1d*-kodierende Plasmid-DNA je Maus, die in vier verschiedenen Muskelgruppen der Beine gespritzt wurde. Für die sekundäre Immunisierung nach 12 Tagen wurden 5×10^6 MSP-1-exprimierende MVA Viren eingesetzt. Eine Kontrollmaus wurde nicht immuni-

siert. Die Analyse von Milzlymphozyten erfolgte nach 10 Tagen. In **A** sind Subpopulationen von Milzlymphozyten einer nicht-immunisierten HHD-2 Maus zu sehen. Gezählt wurden alle Lymphozyten in Fluoreszenzauswahl 1 („Gate“ R1). In den rechten Plots ist die Fluoreszenzintensität des CD8-Rezeptors nach einer Einfachfärbung mit anti-CD8a-FITC Ak zu sehen. Als Negativkontrolle diente eine Doppel-Färbung mit A2/MVA und anti-CD8a. Um die Spezifität des CD8 Aks zu verifizieren, wurde eine Kontrollfärbung mit dem Ak-Isotyp des anti-CD8a-FITC Antikörpers durchgeführt (nicht-dargestellt). In **B** sind untereinander die Ergebnisse von zwei immunisierten Mäusen angeordnet. Milzlymphozyten wurden mit anti-CD8a-FITC markiertem Antikörper und den jeweiligen MSP-1-Peptid/PE-konjugierten Tetrameren (A2/X) behandelt (Beschriftung über den Plots). Als Kontrolle für die Spezifität der Tetramere ist ein CMV-Tetramer. Die angegebenen Zahlen geben die relative Zellzahl im jeweiligen oberen rechten Quadranten in Prozent der CD8+ markierten Zellpopulation an. **C** Gezeigt sind beispielhafte Experimente für eine intrazelluläre IFN- γ Anfärbung in mit Peptid 291, 674, MVA stimulierten Milzlymphozyten nach einer heterologen Immunisierung. Zellen wurden für sechs Stunden mit je 4 $\mu\text{g/ml}$ Peptid stimuliert. Für die Färbung wurden Ak anti-IFN γ -APC und anti-CD8a-FITC verwendet.

In einem anschließenden zweiten DNA-MVA Immunisierungsexperiment (durchgeführt von Dr. Miao unserer Arbeitsgruppe) konnte eine signifikante Zahl Tetramer-positiver T-Zellen für MSP-1 Epitop 291 nachgewiesen werden (nicht dargestellt). Diese T-Zellen waren auch funktionell aktiv, wie über die Detektion von intrazellulärem IFN- γ nach Stimulierung der T-Zellen mit Peptid 291 nachgewiesen wurde (Abb. 5-24, C). Von Dr. Miao wurden weitere heterologe Immunisierungsprotokolle mit variierenden Vektorkompositionen auf ihre Fähigkeit getestet, MSP-1 spezifische T-Zellen zu expandieren. In diesen Versuchen konnte die Immunodominanz des Epitops 291 im Maussystem bestätigt werden.

6 Diskussion

Plasmodium falciparum ist der gefährlichste der humanen Malaria Parasiten. Der Parasit hat verschiedene Strategien entwickelt um dem Immunsystem des Wirts zu entgehen, so daß es in der Natur sehr selten zu einer sterilen Immunität beim Menschen kommt. Dennoch existiert bei Erwachsenen in endemischen Malaria Gebieten eine den Parasiten kontrollierende Immunantwort, die, meist auch, eine niedrige Parasitämie bewirkt. Für die Entwicklung eines Impfstoffes, auf der Basis eines Parasitenproteins, ist es von großer Bedeutung immunogene Bereiche des Moleküls zu charakterisieren, welche zu einer schützenden Immunantwort beitragen.

T-Zellen und B-Zellen erkennen unterschiedliche Bereiche in einem Antigen. Ziel dieser Arbeit, war es sowohl die B-Zell induzierte Antikörperantwort als auch die CD8+ T-Zell vermittelte Immunreaktion gegen MSP-1 zu analysieren und immunogene Bereiche zu definieren. Von Bedeutung ist nach unserer Auffassung, daß die dafür entwickelten experimentellen Systeme sich möglichst an den biologischen Verhältnissen einer natürlichen *Plasmodium* Infektion orientieren. Für die Analyse der Antikörperantwort gegen MSP-1 wurden daher alle natürlichen Prozessierungsuntereinheiten rekombinant hergestellt, um in einem ELISA als Zielantigen verwendet zu werden. Die CD8+ T-Zellantwort war schwieriger zu untersuchen, da zunächst MHC Klasse-I präsentierte Antigen-spezifische Epitope gefunden werden müssen. Zum einen wurde eine *in silico* Vorhersage von potentiellen HLA-A*0201 Epitopen in MSP-1 durchgeführt und die erhaltenen Peptide in einem humanisierten Maussystem auf ihre Immunogenität *in vivo* überprüft. Zum anderen konzentrierten wir uns auf die Entwicklung einer humanen Zelllinie, die über die rekombinante Expression von MSP-1, Epitope des Proteins auf der Oberfläche präsentieren sollte. Diese HLA-A*0201 gebundenen Peptide konnten sequenziert werden.

6.1 Nachweis MSP-1 spezifischer Antikörper in menschlichen Seren gegen MSP-1 Prozessierungsprodukte

IgG Antikörpern wird eine wichtige Rolle bei der Kontrolle einer Infektion mit *P. falciparum* zugeschrieben (Cohen et al. 1961; Groux and Gysin 1990). Auch gegen MSP-1 werden während einer natürlichen Infektion im Menschen Antikörper von B-Zellen gebildet (Muller et al. 1991). Für die Antikörperproduktion sind B-Zellen abhängig von der Stimulierung durch CD4+ Helfer-T-Zellen. Die beiden Kategorien von Immunzellen erkennen unterschiedliche Teile von Antigenen. Für einen auf MSP-1 basierenden Impfstoff wäre es wichtig T-Helfer-Zellepitope zu charakterisieren und Bereiche zu identifizieren gegen die protektive wirkende Antikörper gebildet werden.

In der Vergangenheit hat sich die Forschung hauptsächlich auf den C-terminalen Teil von MSP-1 konzentriert. Natürlich angeeignete menschliche Antikörper gegen p19 wurden in mehreren Studien, mit einem verringerten Risiko assoziiert, an klinischer Malaria zu erkranken, allerdings nicht in allen (Groux and Gysin 1990; Riley et al. 1992; Doodoo et al. 1999). Nur wenige Studien bezogen in ihre Untersuchungen auch anderen Teile von MSP-1 ein, obwohl es schon länger Hinweise gibt, daß auch N-terminale Bereiche für einen Impfstoff von Interesse sein könnten (Tolle, Früh et al. 1993; Cavanagh et al. 2001). So, wurde 1996 von Locher et al ein monoklonaler Antikörper beschrieben, der gegen Block 2 im p83 gerichtet ist

und das Parasitenwachstum hemmt (Locher et al. 1996). Auch wecken aktuelle Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang zwischen Block 2 spezifischen Antikörpern in humanen Seren und Schutz herstellen, neues Interesse am Rest des Moleküls (Conway et al. 2000; Polley et al. 2003). Wie die natürliche humorale Immunantwort gegen die physiologisch prozessierten Fragmente p83, p30, p38 und p42 aussieht, war bis vor kurzem wegen der nicht machbaren Synthese der Proteine unbekannt. In der vorliegenden Untersuchung sollten daher die Antikörpertiter gegen p83, p30, p38, p42 Untersuchung genauer analysiert werden.

6.1.1 Immunogenität der verschiedenen Proteinfragmente

Seren, aus einer Gruppe von Personen eines west-afrikanischen Dorfs in Mali wurden mittels ELISA mit rekombinant hergestellten MSP-1 Untereinheiten des K1-Prototyps auf ihren IgG Bestand untersucht. Die Seren wurden am Ende der Trockensaison eingesammelt. Der gemessene IgG Titer stellt daher die Ausgangssituation, in eine mit hohen Übertragungsraten gekennzeichnete Regensaison dar. In der endemischen Region in Mali wurde eine äußerst geringe Häufigkeit von *P. falciparum*-Parasiten des K1-Typs festgestellt, und ausschließlich Parasiten des MAD-20 Typs nachgewiesen (s. Abb. 1-4) (Früh, Dissertation 1990). Trotzdem reagierten in allen Altersgruppen Seren stark positiv auf die verwendeten K1-Proteine. Dies weist auf eine Kreuzreaktion der Antikörper hin und steht im Einklang mit den Reaktionsmustern, die von Tolle et al. in seiner Studie beschrieben wurden in denen Sequenzen des K1-Typs deutlich schlechter als MAD-20 erkannt werden. Es aber auch eine nachweisbare Kreuzreaktion gibt (Tolle, Früh et al. 1993). Die häufigsten erkannten K1-Fragmente waren bei Tolle et al. die in konservierten bzw. dimorphen Bereichen liegenden „F2“ und „F4“ und „F7“ Fragmente. Die Kreuzreaktion der Antikörper deutet darauf hin, daß es in allen Prozessierungsprodukten konservierte und dimorphe Regionen in MSP-1 gibt, die immunogen sind und eine Isolat-unspezifische Antikörperantwort auslösen können. Kaninchen, die mit verschiedenen rekombinant hergestellten MSP-1(3D7) Fragmenten immunisiert wurden, weisen z.B. Antikörper auf, die beide Alleltypen von p42, p83 und p30 erkennen (Epp, Dissertation 2003). Ausschließlich das anti-38 Serum war spezifisch für die verwendete Immunisierungs-Version von MSP-1 (Epp, Dissertation 2003). In einer Studie von Nicodem und Davidson wurden jedoch Antikörper im Serum von Malaria-infizierten Menschen nachgewiesen, die gegen ein p115 Fragment gerichtet waren, das größtenteils aus dem konservierten Block 12 im p38 besteht (Nikodem and Davidson 2000). Dies zeigt, daß eine Immunantwort gegen den konservierten Bereich von p38 prinzipiell induziert wird. Daher ist eine Kreuzreaktion der afrikanischen Seren gegen den K1 Alleltyp erklärbar, wenn sie gegen den konservierten Bereich von p38 gerichtet ist.

Gegen die C-terminalen Fragmente p42 und p19 war ein klarer altersabhängiger Aufbau der B-Zell vermittelten Immunantwort in Bezug auf die Stärke und Prävalenz der Antikörperantwort zu erkennen. Bei den andern Proteinen war der Anstieg des Antikörpertiters nicht deutlich, da auch bei Kindern zum Teil schon hohe Antikörperspiegel gemessen wurden. Bei den Messungen wurden parasitierte Individuen nicht in die Ergebnisse mit einbezogen. Mit zunehmendem Alter glichen sich die Unterschiede im Antikörpertiter bei p42 und p19 immer mehr aus.

Zahlreiche immunoepidemiologischen Studien haben einen Anstieg der Malaria-spezifischen Immunantwort mit dem Alter dokumentiert (Molineaux et al. 1980; Chizzolini et al. 1988; Shi et al. 1996). Analog dazu konnten wir in der vorliegenden Arbeit gegen die C-terminalen Fragmente p42F und p19F einen klareren altersabhängigen Aufbau der B-Zell-vermittelten Immunantwort in Bezug auf die Stärke und Prävalenz der Antikörperantwort in

malischen Seren erkennen. Der positiv gewertete Anteil an Seren gegen die Fragmente p42 und p38 war wegen hoher Titer kreuz-reaktiver Antikörper bei europäischen Kontrollseren schwierig zu beurteilen. Die Untereinheit p83 wurde im ELISA von fast 100% der Individuen aller Altersgruppen erkannt. Tendenziell waren auch gegen p30 mit der wachsenden Anzahl an Malaria Episoden mehr Seren seropositiv, doch der Anstieg war nicht so deutlich wie für die C-terminalen Fragmente von MSP-1.

Die durchschnittlich höchsten Antikörperspiegel wurden mit p83 detektiert. Unterstützt wird dieses Ergebnis von Tolle et al., der ebenfalls gegen das Fragment M6, das sich im 3D7 p83 befindet, den höchsten Prozentsatz positiver Seren und höchsten Antikörpertiter findet (Tolle, Fruh et al. 1993). Das Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu Befunden von Immunisierungsexperimenten in Maus- und Kaninchen von Tian et al und Dr. Epp. Vergleiche der IgG Titer von immunisierten Tieren gegen einzelne MSP-1 Fragmente zeigen, daß p42 immunogener als p83, p30 und auch p38 ist (Tian et al. 1997) (Epp, Dissertation 2003). Die Fragmente p30, p38 waren in unserer Studie ebenfalls immunogen, bildeten aber untereinander keine klare immunogene Reihenfolge aus. Die humane Antikörperantwort gegen die C-terminale MSP-1 Fragmente p42 und p19 entwickelte sich zu einer vergleichbaren Stärke und Prävalenz. Diese Ebenbürtigkeit in der Immunantwort gegen die beiden Fragmente spiegelt nicht die tatsächlichen immunogenen Eigenschaften der Proteine p42 und p19 wieder. Egan et al. unterteilte die humane Immunantwort gegen p42 in den dimorphen p33 Abschnitt und p19. Er konnte zeigen, daß die Antikörperantwort vor allem gegen die variablen Bereiche im p33 gerichtet und diese weitgehend isolatspezifisch ist, mit einer fast universellen Prävalenz. Antikörper gegen p19 sind hingegen vor allem gegen Disulfid-abhängige konservierte Epitope der EGF-Domänen gerichtet, differenzieren nicht zwischen den beiden Allelvarianten und kommen in weitaus geringerem Maße in Seren klinisch immuner Erwachsener vor (Egan et al. 1997). In Bezug auf p42 und p19 korrelieren unsere Ergebnisse also wahrscheinlich mit dem vorherrschenden MSP-1-Typ, MAD20 und auch RO-33. Diese *P. falciparum* Parasitenstämme sind in der malischen Region aus der die Seren stammen prävalent (Tolle, Fruh et al. 1993). Das im ELISA verwendete p42 entspricht dem K1 Prototyp von MSP-1. Vermutlich binden deswegen hauptsächlich anti-p19 und wenig anti-p33 Antikörper aus den afrikanischen Seren an das Protein.

Es ist zu beachten, daß in dieser Analyse der Gesamtspiegel an IgG-Antikörpern gegen MSP-1 gemessen wurde. Wichtiger als der Gesamtiter kann jedoch das (i) Verhältnis verschiedener Immunglobulin-Isotypen im Serum und (ii) die Menge an Antikörpern sein, die tatsächlich protektiv wirken. Nach neueren Erkenntnissen scheint ein hoher IgG2 und IgG3 und ein niedriger IgG4 Titer mit einer Resistenz gegen *P. falciparum* Malaria assoziiert zu sein (Aucan et al. 2000). In der Literatur wird generell zwischen protektiven Antikörpern und nicht-protektiven Antikörpern gegen MSP-1 unterschieden. Nwuba et al. konnte zeigen, daß Antikörper in humanen Seren auch sogenannte blockierende Antikörper enthalten, die die Bindung eines Prozessierungs-hemmenden und potentiell schützenden Antikörpers gegen p19 blockieren konnten (Nwuba et al. 2002). Jedoch sind solche Ergebnisse im Kontext des jeweiligen experimentellen Systems zu sehen und in Bezug auf ihre *in vivo* Relevanz mit Vorsicht zu interpretieren. Bouharoun et al. demonstrierte vor einiger Zeit, daß zytophile IgGs die entscheidenden Immunglobuline sind. Diese müssen mit Monozyten und Makrophagen kooperieren, um inhibitorisch auf das Parasitenwachstum zu wirken. Die klinisch effektiven IgGs in derselben Studie hatten ohne Makrophagen und Monozyten zum Teil sogar einen fördernden Effekt auf das Parasiten-Wachstum (Bouharoun-Tayoun et al. 1990).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die Prozessierungsfragmente von MSP-1 immunogen sind und hohe Antikörpertiter induzieren, doch kann man aus der bloßen Quantität an Antikörpern keine Korrelationen über Schutz gegen Malaria ableiten.

6.2 Charakterisierung von CD8+ T-Zell-Epitopen in MSP-1

6.2.1 Wie und wo werden zytotoxische T-Zellen gegen MSP-1 Peptide aktiviert?

Da infizierte rote Blutkörperchen keine Antigen-Prozessierungsmaschinerie besitzen, können sie auch keine CD8+ T-Zellen aktivieren. Generell sind während des Lebenszyklus von *Plasmodium* nur Hepatozyten in der Lage, direkt parasitäre-Antigene auf MHC Klasse-I Rezeptoren zu laden und eine zelluläre Immunantwort zu induzieren. Die Frage stellt sich, wie gut die physiologische Antigen-Präsentation von MSP-1 und anderen Antigenen des Parasiten im Hepatozyten funktioniert. Bis jetzt wurden meist nur geringe Häufigkeiten von Plasmodium-spezifischen CD8+ T-Lymphozyten in Individuen gemessen, die natürlichen Malariainfektionen ausgesetzt sind (Aidoo et al. 1995; Lalvani et al. 1996). Es gibt mehrere Gründe, warum in der Natur CD8+ T-Zell-Epitope von leberpräsentierten Parasiten-Antigenen zu einer nur schwachen Effektor-T-Zell Antwort führen könnten. Eine wahrscheinliche Erklärung hat mit dem Infektionsort an sich, der Leber, zu tun. Die Leber ist ein Organ, das die Toleranzinduktion gegen Antigene fördert. Das anti-inflammatorische Milieu begünstigt außer dem Malaria Erreger auch die Entwicklung von Hepatitis B und C Viren (Knolle and Gerken 2000). Zusätzlich hat der Parasit neben den passiven Mechanismen, wie Antigen-Variation, Antigen-Polymorphismus und die Wahl der befallenen Organe, mehrere aktive T-Zell-Suppressions-Mechanismen entwickelt. Eine ganz aktuelle Veröffentlichung von Hisaeda et al. zeigt, wie ein virulenter lethaler Stamm von *P. yoelii* gezielt regulatorische T-Zellen aktiviert, die CD4+ und CD8+ T-Zellen inhibieren (Hisaeda et al. 2004). Ähnliche Möglichkeiten, die CD8+ T-Zell Antwort zu modulieren, sind bei *P. falciparum* bekannt (Urban et al. 1999). Dennoch findet man im Blut Malaria-exponierter Personen CD8+ T-Zellen, die spezifisch für ausschließlich im Leber-Stadium exprimierte Antigene (z.B. LSA-1) sind. Es scheint also trotz allem eine zytotoxische T-Zell Antwort durch infizierte Hepatozyten initiiert zu werden.

Alternativ könnte das „priming“ von CTL-Zellen gegen MSP-1 Epitope auch während des Blutstadiums des Parasiten stattfinden. Zirkulierende Freßzellen wie Monozyten und Makrophagen sind wichtige Abwehrzellen, die mithilfe, Blutstadien von *P. falciparum* zu kontrollieren. Makrophagen und Monozyten können opsonisierte Merozoiten und opsonisierte rote Blutkörperchen aufnehmen (Schwarzer et al. 1992; Cappadoro et al. 1998). Auch unabhängig von Antikörpern wurde die Phagozytose parasitierter Erythrozyten von Makrophagen beschrieben, vermittelt über eine spezifische Rezeptor-Ligand Interaktion (McGilvray et al. 2000). Normalerweise gelangen Peptid-Antigene von Pathogenen, die sich innerhalb Antigen-präsentierender Zellen vermehren, über das Zytoplasma ins ER und werden von MHC Klasse I Molekülen an die Zelloberfläche transportiert. Dagegen werden Peptide, die sich in endo- oder phagozytischen Organellen befinden, von MHC Klasse II Molekülen präsentiert. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen können diese Regel der Antigen-Präsentation jedoch in einem als Kreuz-Präsentation bekannten und seit kurzem aufgeklärten Mechanismus brechen und exogen aufgenommene Antigene in den MHC Klasse-I Weg einschleusen (Houde et al. 2003; Roy 2003). Es könnten parasitäre Antigene über phagozytierte Merozoiten oder auch parasitierte Erythrozyten kreuz-präsentiert

werden und über MHC-Klasse I zur Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen führen. Daher ist es möglich, daß MSP-1, das aus Erythrozyten oder frei im Blut zirkulierenden Merozoiten stammt, auf indirektem Weg über MHC-Klasse I Molekülen präsentiert wird.

Eine genaue Charakterisierung dieser T-Zell-spezifischen MSP-1 Epitope ist von Interesse, da der zelluläre Arm der Immunantwort gegen Malariaparasiten einen wichtigen Beitrag zur Abwehr leistet.

6.3 Zwei Strategien zur Identifikation von CTL-Epitopen

Eine unserer Strategien, um CD8⁺ T-Zellepitope zu identifizieren, basierte auf einer computergestützten Vorhersage potentieller HLA-A*0201 restringierter Epitopen in MSP-1. Diese Methode CTL-Epitope zu finden wird auch als reverse Immunologie bezeichnet und häufig für die Epitopenanalyse von tumor-assoziierten Proteinen angewandt. In mehreren Fällen führten die vorhergesagten Peptide jedoch zu peptid-spezifischen CTL-Zelllinien, die Tumorzellen nicht töten konnten, da die fraglichen Epitope über die zelluläre Maschinerie *in vivo* nicht produziert wurden (Valmori et al. 1997; Zaks and Rosenberg 1998; Ayyoub et al. 2001). Deswegen ist ein wichtiger Schritt bei der Anwendung der reversen Immunologie, daß *in vivo* die Immunogenität der vorhergesagten Peptide bestätigt wird. Dies geschah in unserem Fall über die Verwendung von transgenen Mäusen (HHD-2 Mäuse) die nur HLA-A*0201 restringierte CD8⁺ T-Zellen haben. Über die Analyse von MSP-1 immunisierten HHD-2 Mäusen konnten wir untersuchen welche vorhergesagten Epitope immunogen sind.

Eine Einschränkung bei der oben beschriebenen Vorgehensweise ist die mangelnde Berücksichtigung von anderen Parametern bei der Selektion von Epitopen außer der HLA-Affinität. Es gibt zwar Algorithmen für die Vorhersage der proteasomalen Degradierung eines Antigens, doch die Verlässlichkeit liegt bei ungefähr 60% (Tenzer et al. 2004). Viele Faktoren, die die Epitopselektion bestimmen sind noch nicht genügend erforscht. Das zeigt auch die Arbeit Hanadas et al., der über die Entdeckung von Protein splicing in humanen Nieren-Karzinom-Zellen und daraus resultierenden „Patchwork-Epitopen“ die Anzahl an möglichen präsentierten Epitopen noch erweitert (Hanada et al. 2004). Daher war es uns wichtig, MSP-1 in humanen HLA-A*0201⁺ Zellen zu exprimieren. Die auf den transgenen Zelllinien präsentierten HLA-A2/Antigen Komplexe, sollten auf ihren MSP-1 Epitopbestand analysiert werden. Diese komplexe Analyse von MSP-1 Epitopen kann direkt zwei wichtige Informationen liefern: i) Sequenzen von HLA-A*0201 Epitopen von MSP-1 ii) daß, diese Epitope von menschlichen Zellen tatsächlich aus dem Protein prozessiert und präsentiert werden. Dies wäre ein starkes Indiz für die biologische Relevanz eines Epitops.

Über die beiden gewählten experimentellen Ansatzpunkte zur Charakterisierung biologisch relevanter MSP-1 Killer-T-Zell Epitope konnten zwei Epitope, Peptid 291 und Peptid 674, als immunodominant identifiziert werden.

6.3.1 Zelllinien: Identifiziertes CD8⁺ T-Zell Epitop MSP-1

Regulationspotential der rtTA-Zelllinien

Eine starke Expression von Fremd-Proteinen kann für Zellen toxisch sein, so daß wir uns für eine Tetrazyklin-regulierbare Expression von MSP-1 entschieden. Unsere Strategie MSP-1 Tetrazyklin reguliert zu exprimieren wurde in zwei Schritten umgesetzt. Im ersten Schritt wurde das Gen für den reversen Transaktivator stabil ins Genom der HeLa A2Db Zelllinie integriert. Die stabile Integration des rtTA in einen chromosomalen Locus erfolgte hierbei zufällig. Die physiologische Selektion führte zu Linien, die in nicht-toxischen Konzentrationen reversen Transaktivator konstitutiv produzierten. Da die chromosomale Umgebung

Folgen für die transkriptionelle Aktivität einer Expressionskassette hat, exprimierten die Klone variierende Konzentrationen von rtTA. Die Aktivierbarkeit der P_{tet} -Promotor regulierten MSP-1 Expressionseinheit ist auch abhängig von der Menge an rtTA in der Zelle. Aufgrund dessen suchten wir eine Zelllinie, die ausreichend rtTA enthält um eine möglichst effektive MSP-1 Expression zu induzieren. In transienten Experimenten wurde die Luziferaseaktivität analysiert. Die hohe Kopienzahl intrazellulärer Plasmide in transienten Experimenten führt zu einer Basalaktivität, die generell hoch ist, verglichen mit einzelnen über P_{tet} gesteuerten Transkriptionseinheiten, die stabil in das Genom eingebaut sind. Für unsere Zwecke wurde daher das Augenmerk vor allem auf eine hohe induzierbare Maximalaktivität gerichtet. Der absolute Expressionslevel von Klon 1 war hoch. In der Abwesenheit von Dox betrug die Basalaktivität 0,2% der Luziferase Aktivität des induzierten Zustands. Ein Regulationsfaktor von 500 in transienten Experimenten war indikativ für ein gutes Regulationspotential der HRM-10 Zelllinie.

Analyse der HRM-10 präsentierten MSP-1 Epitope

In dieser Arbeit wurde die p83/30D exprimierende Zelllinie HRM-10 auf präsentierte HLA-A*0201 restringierte Epitope untersucht. Es wurden noch zwei andere analoge Zelllinien etabliert, die das Gesamtlänge MSP-1D und den C-terminal von p30 liegenden Teil von MSP-1D (p38/42D), exprimieren. Die Epitopenalyse von diesen beiden Zelllinien steht noch aus.

Die MSP-1 Epitopenalyse der HRM-10/d-83/30 Zelllinie erfolgte mit einer Methode, die zwischen den massenspektrometrischen Profilen der vorhergesagten Peptiden und Profilen von Peptidfraktionen der Zelllinie vergleicht und gemeinsame Peaks sucht. Dies erleichterte die Identifikation von den interessierenden MSP-1 Peptiden in der großen Masse von irrelevanten doch ebenfalls präsentierten Peptiden enorm. Jedoch hat die Methode den Nachteil, daß nur Epitope erkannt werden, die bei den vorhergesagten Peptiden dabei sind. In unserem Fall waren das alle vorhergesagten Peptide mit einem Bindungswert von mindestens 26. Aufgrund der induzierbaren Expression von p83/30D in der Zelllinie gibt es jedoch zusätzlich die Möglichkeit eine MSP-1 Epitopenalyse unabhängig der vorhergesagten Peptide durchzuführen und dabei möglicherweise auch niedriger affine Epitope zu finden. Man könnte präsentierte Peptidfraktionen von Dox-induzierten versus nicht-Dox induzierten Zellen vergleichen um über differierende Peptid-Peaks MSP-1 relevante Epitope zu identifizieren.

6.3.2 Peptid-Vorhersage: Identifizierte CD8+ T-Zell Epitope in MSP-1

Im ELISpot identifizierte Epitope und Tetramer Herstellung

Unser ELISpot Assay identifizierte eindeutig Peptid 291 als potentiell Kandidatenepitop. ELISpot Experimente unseres Kooperationspartners Dr. Pascolo und Dr. Jean-Philippe Carralot (Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen) bestätigten dieses Ergebnis und charakterisierten zusätzliche drei Peptide als Kandidatenepitope. Die Liste aus ursprünglich 28 berechneten immunogenen Epitopen konnte so auf vier interessante Peptide eingegrenzt werden. In den folgenden Experimenten konzentrierten wir uns auf diese Peptide und stellten rekombinante HLA-A*0201-Peptid Komplexe her, die tetramerisiert wurden (Tetramere). Mit dem Einzigen in einem konservierten Bereich von MSP-1 liegenden Peptid 182 konnten wir keine stabilen Komplexe herstellen. Wie man im Ergebnisteil (Abb. 5-21) sieht, war in der eluierten Komplex-Fraktion nach dem Auftrag auf das PAA-Gel keine schwere Kette mehr zu sehen. Wahrscheinlich zerfällt der Komplex nach und nach in seine Einzelteile, worauf die schwere Kette präzipitiert. Es ist anzunehmen, daß die ineffiziente Bildung des MHC-Komplexes mit der relativ niedrigen MHC-Affinität von Peptid 182 (Bindungswert = 26) zusammenhängt. Eine Korrelation zwischen der MHC-Bindungsaffinität und der Stabilität von MHC/Peptid Komplexen für Klasse I Epitope wurde in mehreren Studien belegt (Sette et al. 1994; van der Burg et al. 1996). Um dennoch mit diesem niedrig-affinen Epitop spezifische CTLs in immunisierten Mäusen messen zu können, veränderte Dr. Miao die Peptidsequenz von 182, ohne dessen Antigen-Spezifität zu beeinflussen. Das ist nach Tourdot et al. möglich, indem man an der ersten Position (P1) die entsprechende Aminosäure durch Tyrosin substituiert (Tourdot, Scardino et al. 2000). Der Bindungswert des Epitops wurde dadurch auf 29 erhöht und stabile Komplexe konnten sich falten. Als zweite Möglichkeit führte eine Verkürzung des zehn AS langen Peptids auf ein Nonamer zu einer vorhergesagten Steigerung des Bindungswertes auf 28. Auch mit diesem Peptid wurden erfolgreich Tetramere hergestellt. Doch das daraus resultierende kürzere Peptid war schon als Peptid „183“ in der Liste der vorausgesagten Peptide (Tab. 5-1) und wurde in insgesamt vier ELISpot Experimenten nicht als immunogenes Epitop identifiziert. Daraus kann man schlußfolgern, daß die Kürzung des Peptids die immunogenen Eigenschaften verändert. In Immunisierungsexperimenten ist deswegen eine Detektion von Epitop-182 spezifischen CTLs mit dem Tetramer-182y und nicht mit Tetramer 182-9 vorzuziehen.

Quantitative CTL Antwort auf MSP-1 Peptide in verschiedenen Immunisierungs-Protokollen in HHD-2 Mäusen

HLA-A*0201-transgene HHD-2 Mäuse wurden mit MSP-1 immunisiert, um immunogene Epitope zu charakterisieren. Dabei wurden verschiedene Immunisierungsstrategien mit dem Ziel ausgetestet, eine möglichst starke und breite Expansion von MSP-1 spezifischen CD8+ T-Zellen zu erhalten. Wir führten Immunisierungen mit rekombinantem MSP-1 exprimierendem Modified-Vacciniavirus-Ankara (MVA) alleine sowie heterologen prime-boost Protokolle mit rekombinantem MSP-1 exprimierendem MVA und Plasmid-DNA durch. Mein Kollege Dr. Miao variierte die Immunisierungs-Protokolle mit verschiedenen Vektoren weiter.

Bei einer einmaligen Immunisierung mit MSP-1-MVA waren die CD8+ T-Zell Häufigkeiten für Peptid 291- und MVA mit maximal 0,2 bzw. 0,7 % bezogen auf die CD8+ Lymphozytenpopulation gering, und lagen wenig über dem Detektionslimit der Tetrameranfärbung. Diese liegt bei ungefähr 0,01% der peripheren Lymphozyten. Vergleicht man bei unter-

schiedlichen Vakzinierungen die Expansion der CD8⁺ T-Zell-Populationen, wird deutlich, daß heterologe prime-boost Protokolle die CD8⁺ Immunantwort stärker stimulierten. Die CD8⁺ T-Zellpopulation der Milzen expandierte bei Einfachimmunisierungen mit MSP-1-MVA von 3-4 % auf 8-9%, während das oben beschriebene prime-boost Protokoll eine Expansion auf 10-13 % zur Folge hatte. Für die Detektion von MSP-1-Epitopspezifische T-Zellen bedeutete das eine 10-fach-50-fach höhere CD8⁺ T-Zell-Zahl. Für das MSP-1 Epitop 291 wurden spezifische T-Zellen von 4,4 % der CD8⁺ Lymphozyten gemessen.

In den Experimenten fiel die Immunantwort gegen MSP-1 bei den Mäusen oft sehr heterogen aus. Die Hierarchie der Epitope war nicht immer konstant. Individuelle Unterschiede in der T-Zell Reaktion bei Mäusen ist jedoch weit verbreitet. Obwohl auch in einzelnen Mäusen gegen andere Epitope, wie 182, 674, 374 und 437 spezifische T-Zellen detektiert werden konnten, war ihre Häufigkeit bis auf das im Ergebnis-Teil gezeigte DNA-MVA Immunisierungsexperiment immer niedriger als für Peptid 291. Eine Hierarchie der Immundominanz konnte wegen der flachen CTL Immunantwort zwischen diesen Epitopen nicht herausgearbeitet werden. Sehr deutlich wurde im Laufe der Experimente jedoch die immunodominante Rolle von Epitop 291. In immunisierten Mäusen konnte in fast allen Vakzinierungsexperimenten eine signifikante Anzahl Epitop-291-spezifischer T-Zellen gemessen werden.

IFN- γ Produktion bei Epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

Als die funktionelle Aktivität der Peptid-spezifischen CTLs verglichen wurde, bestätigte sich die über Tetramer-Färbung gefundene Epitop-Hierarchie. Um die IFN- γ Produktion zu messen, wurde ein FACS-basierter Assay verwendet. Diese Methode ist weniger sensitiv als der ELISpot Assay. Das erklärt, warum im Gegensatz zu den ELISpot Resultaten in den prime-boost Experimenten (DNA-MVA), außer der positiv Kontrolle (Peptid MVA) ausschließlich noch Peptid 291 CD8⁺ T-Zellen zu einer im FACS-Gerät messbaren IFN- γ -Synthese stimulierte. Die anderen vier getesteten MSP-1 Peptide induzierten möglicherweise ebenfalls eine IFN- γ Produktion in den T-Zellen, doch wegen der mangelnden Sensitivität des Assays konnten geringere Konzentrationen des Zytokins nicht detektiert werden.

Tetramer Anfärbung mit HLA-A*0201(A2)-Tetrameren

Wir nutzten routinemäßig A*0201-Tetramere, um CD8⁺ T-Zellen in transgenen HHD-2 Mäusen zu charakterisieren. Im Verlauf der Arbeit wurde bekannt, daß A2-Tetramere möglicherweise ineffizient für die Detektion niedrig-affiner CTLs in A2-transgenen Mäusen sein könnten (Hernandez et al. 2000). Der Grund hierfür wurde in der Tatsache gesucht, daß Maus-CD8 Rezeptoren nicht an humane A2-Moleküle binden können. Der CD8 Ko-Rezeptor beeinflusst aber die Assoziation des T-Zell-Rezeptors an die Klasse I Moleküle (Daniels and Jameson 2000). Um dieses Problem zu lösen kann z.B. eine Domäne des humanen A2-Moleküls durch die analoge Domäne des Maus Kb ersetzt werden, so daß der murine CD8-Rezeptor seine natürliche Bindestelle vorfindet (Choi et al. 2002). Die chimären Tetramere werden A2Kb-Tetramere genannt. Ein Vergleich der chimären mit herkömmlichen A2-Tetrameren hinsichtlich der Fähigkeit in immunisierten HHD-2 Mäusen spezifische CTLs anzufärben, zeigte die verbesserte Sensitivität der chimären Moleküle (Palmowski et al. 2002). Der Unterschied im Färbeverhalten fällt vor allem bei der Detektion einer Immunantwort gegen schwach immunogene Epitope ins Gewicht.

Es ist bekannt, daß T-Zellen mit einer hohen funktionellen Avidität sehr effizient virale und Tumor Antigene erkennen und besser als niedriger affine T-Zellen virale Infektionen und Tumorstadium bremsen können (Speiser et al. 1992; Zeh et al. 1999; Dutoit et al.

2001). Die Detektion gerade dieser Population von CTLs kann also ein gutes Maß für die Wirksamkeit einer Immunisierung sein. A*0201-Tetramere in HHD-2 Mäusen erkennen CTLs mit niedriger Affinität nur mangelhaft. Unter diesem Gesichtspunkt betrachtet, unterschieden wir mit den A*0201-Tetrameren in HHD-2 Mäusen hoch-affine von niedrig-affinen T-Zellen. Vermutlicherweise detektierten wir daher insgesamt weniger Epitop-spezifische T-Zellen, als eigentlich in den immunisierten Mäusen vorhanden waren und identifizierten nur die hoch-affinen T-Zellen. Durch die stringenteren Messbedingungen wurden Unterschiede im immunogenen Potential der Epitope besonders deutlich. Nur das immunogenste Epitop 291 induzierte mehrmals signifikante Populationen von spezifischen T-Zellen. Ähnliche Ergebnisse werden auch in der Studie von Choi gezeigt. „CD8-null-Tetramere“ identifizierten selektiv hoch-affine CTLs, die das Antigen schon in physiologischen Konzentrationen erkannten (Choi, Palmowski et al. 2002). In unserem Beispiel waren 291 spezifischen T-Zellen auch funktionell sehr aktive T-Zellen, wie über die IFN- γ -Färbung demonstriert wurde.

6.3.3 Unterschiede in der Epitop-Hierarchie bei immunisierten HHD-2 Mäusen und malariaexponierten Menschen

Von den 27 im ELIspot-Assay getesteten Peptiden, die nach der *in-silico* Vorhersage mit hoher und mittlerer Affinität an HLA-A*0201 binden, konnten wir in immunisierten Mäusen nur für 4 Peptide spezifische CD8+ T-Zell-Reaktionen nachweisen. Eines der vorhergesagt hoch-affinen Peptide, Peptid 674, wurde in MSP-1 exprimierenden HeLa Zellen physiologisch an HLA-A*0201 gebunden und auf der Zelloberfläche präsentiert. Zudem weisen unsere vorläufigen Ergebnisse darauf hin, daß dieses Epitop bei natürlichen *P. falciparum* Infektionen von allen getesteten MSP-1 Epitopen die dominanteste CD8+-Immunantwort induziert (s. unteren Abschnitt). Diese Immunodominanz konnte in immunisierten HHD-2 Mäusen nicht reproduziert werden. Die Hierarchie war hier eindeutig zugunsten des Epitops 291 verschoben. Das HHD-2 Maus-System ist zwar ein sehr nützliches Modell, um präklinische Impfstoffe zu testen, die entwickelt werden, um HLA-A*0201 spezifische CTL Antworten im Menschen zu induzieren. Es gibt aber Faktoren, die dazu beitragen, daß HHD-2 Mäuse auf bestimmte Epitope gar nicht oder sehr variabel reagieren. Das kann theoretisch über ein begrenztes und variables TCR-Repertoire erklärt werden (Wentworth et al. 1996) oder an Unterschieden der murinen und humanen Antigen-Prozessierungs- und Präsentationsmaschinerie liegen. Im Vergleich zu Mäusen mit murinem MHC-I Repertoire haben HHD-2 Mäuse eine kleinere CTL-Populationen, was dazu führen kann, daß gegen Epitope die Auswahl an passenden T-Zell-Rezeptoren geringer ist (Mateo et al. 1999). Allerdings scheint das in unserem Fall nicht das Hauptproblem zu sein, da prinzipiell CD8+ T-Zellen gegen Epitop 674 gemessen wurden.

Eine weitere Möglichkeit, warum in HHD-2 Mäusen eine abweichende Epitop-Hierarchie detektiert wurde, ist eine Spezies-spezifische Bildung von Peptid-Epitopen, die Peptid 674 als Produkt ausschließt. Für das HHD-2 Mausmodell wird grundsätzlich erst einmal vorausgesetzt, daß die Antigen-Präsentation zwischen konserviert ist, einschließlich der physiologischen Peptid Bildung und Selektion über humane MHC I Moleküle in murinen Antigen-präsentierenden Zellen. In vielen Fällen stimmt dies auch. Aber es gibt Ausnahmen, wie eine Studie von Street et al. am Beispiel des E7 Onkoproteins demonstriert. Während HLA-A*0201+ Menschen E7 CTL Epitope aus dem Gesamtprotein prozessieren konnten, waren die transgenen Mäuse dazu nicht in der Lage (Street Immunology 2002). Die Frage stellt sich, warum HLA-A*0201 transgene Mäuse manche Proteine nicht so prozessieren können, daß die Epitop-Bildung mit humanen HLA-A*0201 Trägern übereinstimmt. Es gibt viele

Ebenen bei Präsentierungsprozessen, in denen eine Störung dazu führen kann, daß einige Epitope nicht präsentiert werden. Dazu gehört zum Beispiel der Verdau des Proteins durch Endopeptidasen und die Translokation und Insertion der Peptid-beladenen Klasse I Moleküle in die Zellmembran. Es kann auch während des Transports des Peptids über TAP in das ER-Lumen zu einer selektiven Störung kommen. Murine TAP Proteine scheinen selektiver als die humanen Äquivalente zu sein (Momburg et al. 1994). Ein kritischer Punkt in der Bildung von Peptid/ MHC Komplexen ist auch das ER-Protein Tapasin, das für die Stabilisierung des Komplexes zuständig ist und auch direkten Einfluss auf die Peptid-Beladung hat (Lehner et al. 1998; Peh et al. 2000). Alternativ können in den humanisierten Mäusen die multiplen molekulare Interaktionen suboptimal sein, die für die Assoziation von leere Klasse I/ leichte Kette Komplexe mit Calnexin, Calretikulin und ER-60 Chaperonen notwendig sind (Degen et al. 1992; Lindquist et al. 1998).

Interessant ist auch die Vorstellung, daß die Position eines Epitops innerhalb des gefalteten Gesamtkonstrukts die Prozessierungseffizienz beeinflusst. Flankierende Regionen und der spezielle molekulare Kontext eines Epitops können in einigen Fällen die Immunogenität verändern (Del Val et al. 1991; Bergmann et al. 1994; Ishioka et al. 1999). In unseren Experimenten wurden HHD-2 Mäuse alle mit MVA-Viren immunisiert, die das ganze MSP-1D exprimieren. Die konstruierte HRM-10/d-83/30 hingegen exprimierte nur die N-terminale Hälfte p83/30D von MSP-1D. In malaria-infizierten Individuen befindet sich innerhalb der infizierten Hepatozyten ebenfalls außer unprozessiertem MSP-1 (p190) auch der Protein-Komplex aus vier proteolytisch erhaltenen Untereinheiten p83, p30, p38 und p42. Kauth et al. zeigt in seiner Untersuchung der strukturellen Eigenschaften von MSP-1, daß der Komplex in vitro aus seinen einzelnen Untereinheiten reassembliert werden kann, aber auch aus den beiden Hälften p83/30 und p42/38 (Kauth et al. 2003). Dies impliziert, daß p83/30 bereits strukturelle Eigenschaften des rekonstituierten Komplexes aufweist und könnte erklären, warum Peptid 674 von der konstruierten HLA-Zelllinie und während einer natürlichen Malaria-Immunantwort präsentiert wird, bei einer Immunisierung von HHD-2 Mäusen mit dem vollständigen MSP-1 aber nicht zu einer Bildung von spezifischen T-Zellen führt.

6.3.4 Epitop-Lokalisation und Implikationen für die Impfstoffentwicklung

Die Entwicklung eines Impfstoffs, der auf eine immunogene Wirkung von CTL-Epitop Sequenzen abzielt, muss zwei problematische Aspekte berücksichtigen. Zum einen unterscheidet sich beim Menschen der HLA-Phänotyp stark zwischen einzelnen Individuen. Damit unterscheiden sich aber auch die Anforderungen an Peptid-Motive, die für eine Bindung an jeweilige HLA-Alleltypen notwendig sind. Dies bedeutet, daß Individuen je nach HLA-Status der CD8+ T-Zellen ein unterschiedliches Repertoire an Peptiden präsentieren. Theoretisch müssen daher CTL Epitope in einem Impfstoff individuell auf den HLA-Typ der zu impfenden Menschen zugeschnitten sein. Zudem müssten für unterschiedliche HLA-Allotypen individuelle immunogene Epitope gefunden werden. Zwei Punkte könnten diese Probleme schmälern:

- Es wurde gezeigt, daß es viele HLA-Allele gibt (sogenannte HLA-Supertypen), deren Peptid-Bindungs-Spezifitäten sich überlappen. Del Guercio et al. demonstrierte, daß es für HLA-A2 Peptide Motive gibt, die an HLA-A*0201, *0202, *0205, *0206, *6802 und *6901 binden können (del Guercio et al. 1995). Auch für den HLA-A3 und HLA-B7-Supertyp sind Peptid-motive publiziert, die in dem jeweiligen Supertyp konserviert sind (Sidney et al. 1996; Sidney et al. 1996). Jeder der drei Supertyp-Allele ist in den meisten Bevölkerungsgruppen zu 40-

60% vertreten. Dies impliziert, daß man immunogene CD8+ T-Zellepitope definieren kann, die für eine große Population relevant sind und schützend wirken können.

- Der zweite Punkt hängt mit der Frage zusammen, ob andere potentiell HLA-bindende Peptide die aus homologen Regionen der MSP-1 Kandidaten-Peptiden stammen ebenfalls bevorzugt T-Zell Epitope konstituieren können. Es gibt schon länger Beispiele in der Literatur, daß sich Epitope in Regionen hoher Immunogenität häufen (Culmann et al. 1991). Dieses Phänomen wird „Epitop-clustering“ genannt. Unabhängig von einer variablen Expression der HLA-Klasse I Allele fand Goulder et al. bei 81 HIV-infizierten Individuen, dominante Epitop-spezifische CTL Reaktionen, die gegen einige hoch immunogene Regionen im Protein Gag gerichtet waren (Goulder et al. 2000). Auch im Fall der Tumor-Antigene MAGE-1 und MAGE-3 können zwei homologe, aber nicht identische Peptide als HLA-A1-spezifische Epitope voneinander unabhängige CTL-Populationen aktivieren (Romero et al. 1995). Unsere Daten zeigen nun, daß in der näheren Umgebung des Epitop 291 zwei weitere immunogene Peptide liegen (374, 437). Es sieht daher so aus, daß sich auch bei MSP-1 in einer spezifischen Region immunogene Epitope häufen.

MSP-1 enthält auch Regionen, die zwischen verschiedenen *P. falciparum*-Stämmen nicht konserviert sind. Daher wäre es wünschenswert, ein Epitop zu finden, das unabhängig vom infizierenden Parasitenstamm schützend wirkt. Ein solches Epitop müßte in einem Sequenzbereich von MSP-1 liegen, in dem die antigenen Eigenschaften des in diesem Fall HLA-A*0201 restringierten Epitops konserviert sind. Dies bedeutet nicht, daß die Peptidsequenz identisch sein muß. Zu Peptid 674 homologe MSP-1-Peptide aus anderen Parasitenstämmen unterscheiden sich nur in der vierten und sechsten Position der AS-Sequenz „KLKEFIPKV“ (AS Nr. 674, Block 7, MSP-1(3D7)). Für homologe Peptide von Epitop 291 sind zwei Aminosäuresubstitutionen in Position vier und sieben bekannt (Miller et al. 1993). Peptid 437 liegt zwar in einer mäßig konservierten Region, doch es gibt nur ein alternatives homologes Peptid, das an Position zwei Isoleucin mit Leucin substituiert. Dagegen sind in der AS-Sequenz des K1- im Vergleich zu 3D7-Prototyps für das Peptid 374 fast alle Aminosäuren ausgetauscht. Auch für das sich in einer konservierten Region befindende Peptid 182 gibt es zwei homologe nicht-identische Peptide. Nach einer *in silico* Analyse in SYFPEITHI haben homologe Peptide von Peptid 674 einen Bindungsscore von 24. Der Score der homologen Peptide von 291 und 437 ist mit einer errechneten Bindungsstärke von 30 (291) und 29 (437) sogar höher als für die hier analysierten Peptide des 3D7 Stammes. Bei Epitop 374 ist es eher unwahrscheinlich, daß das homologe Peptid mit einem Bindungskoeffizient von 15 ein natürliches Epitop für HLA-A*0201 sein kann. Von den zwei Varianten des Epitops 182 erhöht eine den Bindungswert auf 29 (Stamm Ghana-NF7), die andere senkt ihn auf 20. Ein Großteil der Kandidatenepitope könnte theoretisch auch in anderen Parasitenstämmen auf A2-Komplexe geladen werden. Zusammenfassend, bedeutet dies, daß die Peptide 674, 291 und 437 möglicherweise auch bei einer Infektion mit dem heterologen Parasitenstamm K1 über HLA-A*0201 präsentiert werden und CD8+ T-Zellen aktivieren können.

Validierung der biologischen Relevanz von Epitop 674 und Epitop-Hierarchie in Malaria-exponierten Menschen

In einem ersten Experiment wurde von Dr. Miao mittels A*0201-Tetrameren untersucht, ob es in HLA-A*0201 Individuen aus einem malaria endemischen Gebiet aus Burkina Faso, CD8+ T-Zellen gibt, die spezifisch für die untersuchten MSP-1 Epitope sind. Die Ergebnisse sind als hoch-indikativ einzustufen, müssen aber in weiteren Experimenten bestätigt werden. Alle untersuchten Individuen hatten MSP-1 spezifische CD8+ T-Zellen, gegen

mindestens eines der fünf untersuchten Epitope. In elf analysierten peripheren Blutproben, konnte man ein Hierarchie-Muster erkennen. Das in den Individuen am häufigsten erkannte Epitop, das die größten T-Zell-Populationen markierte war Epitop 674 (s Diskussion unten). Zusätzlich war auch Kandidatenepitop 291 das Ziel einer dominanten CD8+ T-Zell Antwort. Auch für die anderen Epitope 374, 437, 182 wurden einige spezifische CD8+ T-Zellen in den Proben identifiziert. Funktionelle Analysen Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen aus diesen Proben wurden noch nicht vorgenommen.

6.4 Ausblick

6.4.1 Experimentelle Möglichkeiten mit den Kandidatenepitopen

Diagnostik

Die ersten Versuche, MSP-1 spezifische CD8+ T-Zellen in PBMCs von malaria-exponierten Individuen mittels Tetramer-Färbung zu messen, waren sehr ermutigend. Es scheinen gegen alle fünf getesteten MSP-1 Peptide spezifische CD8+ T-Zellen im peripheren Blut zu existieren. Unabhängig davon, ob die Epitop-spezifischen CD8+ T-Zellen eine schützende Wirkung haben, eignet sich dieser Ansatz hervorragend zur Analyse der zellulären CD8+ Immunantwort gegen einen MSP-1 basierten Impfstoff. Hierbei könnte zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Impfprotokolls Blut der Probanden entnommen und Gesamtblut direkt für die Tetramer-Färbung verwendet werden, ohne daß eine Zellkultur angelegt werden muss. Die verhältnismäßig einfach durchzuführende Tetramer-Anfärbung ist daher auch besonders für „Feld-Bedingungen“ in Afrika geeignet.

6.4.2 Epidemiologische Studien

Es entstehen nach unseren jetzigen Erkenntnissen bei einer *P. falciparum* Infektion CD8+ T-Zellen, die spezifisch unsere Kandidatenepitope von MSP-1 erkennen. Eine besonders interessante weitergehende Fragestellung ist, ob MSP-1 spezifische CD8+ T-Zellen während einer Malaria Infektion eine schützende Wirkung entfalten, und ob der Aufbau einer CD8+ T-Zell Antwort altersabhängig verläuft. In endemischen Gebieten kann in longitudinalen Studien auch untersucht werden, wie sich die Stärke und die Hierarchie der Immunogenität einer CD8+ T-Zell-Antwort entwickelt. Solche Studien können einen wichtigen Beitrag für die rationale Impfstoffentwicklung leisten.

6.4.3 Funktionelle Aktivität und Phänotyp der CD8+ T-Zellen

In zukünftigen Experimenten sollen MSP-1 spezifische CD8+ T-Zellen genauer charakterisiert werden. *P. falciparum*-Parasiten haben Mechanismen entwickelt, um einer T-Zell Immunantwort zu entkommen. So wird z.B. die Reifung von dendritischen Zellen gestört. Malariapatienten zeigen eine reduzierte Immunreaktion nicht nur gegen den Malariaparasit sondern auch gegenüber Antigenen anderer Erreger (Ho et al. 1988; Urban, Ferguson et al. 1999). Die Leber ist ein Organ, das Toleranz-induzierend wirkt und möglicherweise die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Effektor-T-Zellen unterdrückt (Knolle and Gerken 2000). Auf Grund dessen ist nach heutigem Wissenstand nicht einzuschätzen, wie aktiv die detektierten Epitop-spezifischen CD8+-T-Zellen sind.

In normalen Individuen gibt es sehr heterogene Populationen von CD8+ T-Zellen, die sich in ihren funktionellen und phänotypischen Eigenschaften unterscheiden. Für Impfstoff-

studien ist vor allem die Detektion von Gedächtnis T-Zellen von Interesse, da diese Gruppe eine schnelle und effektive Reaktion auf den Kontakt mit dem entsprechenden Antigen zeigt. Die Analyse von Zell-Oberflächenmolekülen auf MSP1-spezifischen T-Zellen kann helfen, CD8⁺ T-Zellen als Gedächtnis- oder naive T-Zellen zu klassifizieren (van Lier et al. 2003) und dementsprechend die Impfstoffstrategie zu modifizieren.

Nach Stimulation mit dem entsprechenden MSP-1 Peptid soll untersucht werden, ob Epitop-spezifische T-Zellen IFN- γ bilden können, da dieses Zytokin nach Aktivierung ausgeschüttet wird. Das Zytokin IFN- γ kann nach einer kurzen Kultivierung der T-Zellen intrazellulär mittels FACS-Analyse gemessen werden. Eine Messung der Aktivität spezifischer T-Zellen ist auch mit ELISpot-Assays in hoher Spezifität möglich. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde die IFN- γ Antwort gegen CD4⁺ T-Zell Epitope des Sporozoitenproteins CSP mittels ELISpot-Assays untersucht, sowohl ex vivo als auch nach zwei wöchiger Kultivierung der Lymphozyten. Dabei zeigte sich, daß das schützende Potential dieser Peptide nur nach längerer Zellkulturperiode vor der IFN- γ Messung identifiziert werden konnte. Nur dadurch wurde die Reaktion einer speziellen Gruppe von Gedächtnis-T-Zellen eingefangen (Reece et al. 2004). Die in vivo Situation einer CTL-Antwort gegen MSP-1 kann so zukünftig mit verschiedenen funktionellen Assays besser reflektiert werden.

6.5 MSP-1 und Impfstoffdesign

Die Entwicklung eines Blut-Stadium Impfstoffes gegen *P. falciparum* fokussiert besonders auf Merozoiten Oberflächenantigene. Ein favorisierter Impfstoffkandidat ist MSP-1. Das Hauptziel eines Impfstoffes gegen die Blutstadien von *P. falciparum* ist die Linderung der Krankheits-Symptome und nicht primär die Erzeugung einer sterilen Immunität.

Im Augenblick gibt es viele Hinweise, daß die Antikörper-Antwort gegen Merozoiten-MSP-1 zur natürlich angeeigneten Immunantwort beiträgt. Ein effektiver Blutstadiums-Impfstoff gegen MSP-1 muß hohe Antikörper Titer induzieren. Der humorale Teil des Immunsystems kann über eine rekombinante Protein-Vakzine effektiv stimuliert werden. In der Literatur werden verschiedene Untereinheiten des Proteins mit Schutz und Immunogenität assoziiert, so daß wir einen Impfstoffansatz verfolgen, der alle Untereinheiten enthält.

In dieser Arbeit haben wir immunogene T-Zellepitope in MSP-1 identifiziert. Außerdem konnten wir zeigen, daß es CD8⁺ T-Zellen gibt, die spezifisch gegen MSP-1 gerichtet sind. Daher ist es wahrscheinlich, daß auch bei einer natürlichen *Plasmodium* Infektion eine CD8⁺ T-Zellreaktion gegen diese Epitope aufgebaut wird. Das eröffnet die Perspektive auf einen Blutstadiumsimpfstoff mit MSP-1, der nicht nur Merozoiten im Blut bekämpft sondern auch gegen intrazelluläre Parasiten in der Leber wirksam sein kann. Dies macht MSP-1 als Impfstoff noch interessanter. Wegen dieser Überlegung wird von uns eine CTL-Antwort im Impfstoffdesign berücksichtigt.

Ein Impfstoff, der effektiv CD8⁺ T-Zellen stimuliert, sollte eine maximale Expansion der Effektor T-Zellen anstreben, da die Stärke der ersten Reaktion direkt mit dem immunologischen Gedächtnis korreliert ist. Für die Qualität einer sekundären Immunantwort der CD8⁺ Zellen sind CD4⁺ T-Zellen entscheidend. Diese programmieren CD8⁺ T-Zellen für eine Expansion bei wiederholtem Kontakt mit z.B. dem natürlichen Erreger oder einer Impfung (Seder and Ahmed 2003). Deswegen ist es wünschenswert, sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ Epitope in einem Impfstoff zu vereinigen (Rammensee et al. 2002). Die verbreitete Verwendung von Teilfragmenten von MSP-1 wie p42 oder p19 bei der Entwicklung eines Impfstoffs birgt die Gefahr, daß Parasiten mutieren, wichtige Epitope verändert werden somit die Schutzwir-

kung des Impfstoffes verloren geht. Dieser Gedanke liegt nahe, da die C-terminalen Bereiche bei *Plasmodien* zwar eine ausgeprägte funktionelle Konservierung besitzen, die es erlaubt die Bereiche zwischen entfernt verwandten *Plasmodien* Stämmen auszutauschen, aber keine sequenzielle. Das gesamte MSP-1 mit seinen 190 kDa wäre hingegen ein multivalenter Impfstoff, der genügend potentielle Epitope beinhaltet um solchen Mechanismen zu entgehen. Ein weiterer Punkt ist, daß bei kleineren Fragmenten der Immunisierungserfolg vom HLA-Typ des Probanden abhängen kann. Nutzt man das gesamte Protein für eine Immunisierung, spielt die HLA-Restriktion des Probanden auf Grund der Anzahl an unterschiedlichen Epitopen keine Rolle, und sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Zellen können potentiell induziert werden, vorausgesetzt, die Immunisierungsbedingungen stimmen. Die Möglichkeit MSP-1 mit andern Antigenen aus demselben oder anderen Entwicklungsstadien zu kombinieren besteht, wäre aber nach diesen Überlegungen nicht zwingend notwendig.

Rekombinante virale Vektoren gelten als effektive Impfstoff-Typen und können eine starke CD8+ T-Zell Antwort auslösen. In unserem Labor wurden MVA-Viren entwickelt, die rekombinant MSP-1 exprimieren (Westerfeld, Dissertation 2002). In Prime-Boost Impfprotokollen mit DNA-Erstimmunisierungen und nachfolgenden viralen Impfungen wurden solche Vektoren in klinischen Versuchen für HIV und Malaria schon getestet (Amara, Villinger et al. 2001; Schneider et al. 2001; Moorthy et al. 2003). MVA wurde als Impfstoff eingesetzt, um die Pocken auszurotten. Daher ist das Virus als Impfstoff am Menschen zugelassen und gilt auch bei immunsupprimierten Personen als sehr sicher (Mayr et al. 1978). Als vielversprechend gilt auch die Entwicklung rekombinanter Masernviren. Der attenuierte Masernvirus vermittelt durch eine einmalige Impfung im Kindesalter einen lebenslangen Schutz und gilt als hoch effektiv. In einer Kooperation mit Berna Biotech wird das MSP-1 Gen in Masernviren integriert und soll so als Impfstoff verwendet werden. Von Vorteil ist auch, daß in Masernviren eingebaute Konstrukte eine hohe genetische Stabilität aufweisen.

MSP-1 rekombinantes Protein soll in Kombination mit viralen Impfstoffen zu einem potenten Impfstoffprotokoll führen. Passiv über die Plazenta angeeignete Masern-Antikörper können den Vektor neutralisieren, bevor die Immunantwort sich entwickelt. Da die Zielgruppe des Impfstoffes jedoch vor allem Kleinkinder und Kinder sind, eignet sich der rekombinante Masernvektor nicht für eine Erstimmunisierung, sondern könnte für die Verstärkung einer primär induzierten Immunantwort nützlich sein. Bei der Erstimmunisierung könnte eine Proteinformulierung als Impfstoff dienen.

Obwohl verschiedene Impfprotokolle an Tiermodellen auf ihre immunogene Wirkung getestet werden können, ist die Immunantwort gegen den Malariaerreger zu komplex um vorherzusehen, wie sich die Impfung auf Menschen auswirkt, die ständig der natürlichen Infektion ausgesetzt sind. Offensichtlich gibt es auf dem Weg zu einem Impfstoff gegen *Plasmodium* Erreger noch einige Hürden zu meistern. Eine detaillierte immunologische Charakterisierung der einzelnen zu verwendenden Parasiten-Antigene und die Analyse von effektiven Impfstoff-Verabreichungsformen für diese Antigene ist einer der essentiellen Schritte auf dem Weg zu einer Malaria Vakzine.

7 Literatur

- Aidoo, M., A. Lalvani, et al. (1995). "Identification of conserved antigenic components for a cytotoxic T lymphocyte-inducing vaccine against malaria." *Lancet* **345**(8956): 1003-7.
- Aidoo, M., A. Lalvani, et al. (2000). "Cytotoxic T-lymphocyte epitopes for HLA-B53 and other HLA types in the malaria vaccine candidate liver-stage antigen 3." *Infect Immun* **68**(1): 227-32.
- Alam, J. and J. L. Cook (1990). "Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription." *Anal Biochem* **188**(2): 245-54.
- Altman, J. D., P. A. Moss, et al. (1996). "Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes." *Science* **274**(5284): 94-6.
- Amante, F. H. and M. F. Good (1997). "Prolonged Th1-like response generated by a Plasmodium yoelii-specific T cell clone allows complete clearance of infection in reconstituted mice." *Parasite Immunol* **19**(3): 111-26.
- Amara, R. R., F. Villinger, et al. (2001). "Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine." *Science* **292**(5514): 69-74.
- Aribot, G., C. Rogier, et al. (1996). "Pattern of immunoglobulin isotype response to Plasmodium falciparum blood-stage antigens in individuals living in a holoendemic area of Senegal (Dielmo, west Africa)." *Am J Trop Med Hyg* **54**(5): 449-57.
- Aucan, C., Y. Traore, et al. (2000). "High immunoglobulin G2 (IgG2) and low IgG4 levels are associated with human resistance to Plasmodium falciparum malaria." *Infect Immun* **68**(3): 1252-8.
- Ayyoub, M., M. Migliaccio, et al. (2001). "Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8(+) T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing." *Eur J Immunol* **31**(9): 2642-51.
- Baruch, D. I., B. L. Pasloske, et al. (1995). "Cloning the P. falciparum gene encoding PfEMP1, a malarial variant antigen and adherence receptor on the surface of parasitized human erythrocytes." *Cell* **82**(1): 77-87.
- Bergmann, C. C., L. Tong, et al. (1994). "Differential effects of flanking residues on presentation of epitopes from chimeric peptides." *J Virol* **68**(8): 5306-10.
- Berhe, S., P. Gerold, et al. (2000). "Plasmodium falciparum: merozoite surface proteins 1 and 2 are not posttranslationally modified by classical N- or O-glycans." *Exp Parasitol* **94**(3): 194-7.
- Bhaumik, S., X. Z. Lewis, et al. (2004). "Optical imaging of Renilla luciferase, synthetic Renilla luciferase, and firefly luciferase reporter gene expression in living mice." *J Biomed Opt* **9**(3): 578-86.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res* **7**(6): 1513-23.
- Blackman, M. J., H. G. Heidrich, et al. (1990). "A single fragment of a malaria merozoite surface protein remains on the parasite during red cell invasion and is the target of invasion-inhibiting antibodies." *J Exp Med* **172**(1): 379-82.
- Blackman, M. J., T. J. Scott-Finnigan, et al. (1994). "Antibodies inhibit the protease-mediated processing of a malaria merozoite surface protein." *J Exp Med* **180**(1): 389-93.
- Bojang, K. A., P. J. Milligan, et al. (2001). "Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against Plasmodium falciparum infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial." *Lancet* **358**(9297): 1927-34.
- Borrego, F., J. Kabat, et al. (2002). "Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells." *Mol Immunol* **38**(9): 637-60.
- Bouharoun-Tayoun, H., P. Attanath, et al. (1990). "Antibodies that protect humans against Plasmodium falciparum blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes." *J Exp Med* **172**(6): 1633-41.
- Bouharoun-Tayoun, H., C. Ouevray, et al. (1995). "Mechanisms underlying the monocyte-mediated antibody-dependent killing of Plasmodium falciparum asexual blood stages." *J Exp Med* **182**(2): 409-18.
- Boyle, J. S. and A. M. Lew (1995). "An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification." *Trends Genet* **11**(1): 8.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Bull, P. C. and K. Marsh (2002). "The role of antibodies to Plasmodium falciparum-infected-erythrocyte surface antigens in naturally acquired immunity to malaria." Trends Microbiol **10**(2): 55-8.
- Burrows, S. R., N. Kienzle, et al. (2000). "Peptide-MHC class I tetrameric complexes display exquisite ligand specificity." J Immunol **165**(11): 6229-34.
- Cappadoro, M., G. Giribaldi, et al. (1998). "Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency." Blood **92**(7): 2527-34.
- Cavanagh, D. R., C. Dobano, et al. (2001). "Differential patterns of human immunoglobulin G subclass responses to distinct regions of a single protein, the merozoite surface protein 1 of Plasmodium falciparum." Infect Immun **69**(2): 1207-11.
- Chang, S. P., S. E. Case, et al. (1996). "A recombinant baculovirus 42-kilodalton C-terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 protects Aotus monkeys against malaria." Infect Immun **64**(1): 253-61.
- Chizzolini, C., A. Dupont, et al. (1988). "Natural antibodies against three distinct and defined antigens of Plasmodium falciparum in residents of a mesoendemic area in Gabon." Am J Trop Med Hyg **39**(2): 150-6.
- Choi, E. M., M. Palmowski, et al. (2002). "The use of chimeric A2K(b) tetramers to monitor HLA A2 immune responses in HLA A2 transgenic mice." J Immunol Methods **268**(1): 35-41.
- Clark, I. A., W. B. Cowden, et al. (1987). "Possible roles of tumor necrosis factor in the pathology of malaria." Am J Pathol **129**(1): 192-9.
- Clyde, D. F., H. Most, et al. (1973). "Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria." Am J Med Sci **266**(3): 169-77.
- Cohen, S., G. I. Mc, et al. (1961). "Gamma-globulin and acquired immunity to human malaria." Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia **192**: 733-7.
- Collins, W. E., D. Pye, et al. (1994). "Protective immunity induced in squirrel monkeys with recombinant apical membrane antigen-1 of Plasmodium fragile." Am J Trop Med Hyg **51**(6): 711-9.
- Connelly, M., C. L. King, et al. (1997). "T-cell immunity to peptide epitopes of liver-stage antigen 1 in an area of Papua New Guinea in which malaria is holoendemic." Infect Immun **65**(12): 5082-7.
- Conway, D. J., D. R. Cavanagh, et al. (2000). "A principal target of human immunity to malaria identified by molecular population genetic and immunological analyses." Nat Med **6**(6): 689-92.
- Cooper, J. A. and H. Bujard (1992). "Membrane-associated proteases process Plasmodium falciparum merozoite surface antigen-1 (MSA1) to fragment gp41." Mol Biochem Parasitol **56**(1): 151-60.
- Culmann, B., E. Gomard, et al. (1991). "Six epitopes reacting with human cytotoxic CD8+ T cells in the central region of the HIV-1 NEF protein." J Immunol **146**(5): 1560-5.
- Daly, T. M. and C. A. Long (1995). "Humoral response to a carboxyl-terminal region of the merozoite surface protein-1 plays a predominant role in controlling blood-stage infection in rodent malaria." J Immunol **155**(1): 236-43.
- Daniels, M. A. and S. C. Jameson (2000). "Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers." J Exp Med **191**(2): 335-46.
- Daubersies, P., A. W. Thomas, et al. (2000). "Protection against Plasmodium falciparum malaria in chimpanzees by immunization with the conserved pre-erythrocytic liver-stage antigen 3." Nat Med **6**(11): 1258-63.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, et al. (1987). "Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells." Mol Cell Biol **7**(2): 725-37.
- Degen, E., M. F. Cohen-Doyle, et al. (1992). "Efficient dissociation of the p88 chaperone from major histocompatibility complex class I molecules requires both beta 2-microglobulin and peptide." J Exp Med **175**(6): 1653-61.
- del Guercio, M. F., J. Sidney, et al. (1995). "Binding of a peptide antigen to multiple HLA alleles allows definition of an A2-like supertype." J Immunol **154**(2): 685-93.

- Del Val, M., H. J. Schlicht, et al. (1991). "Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein." *Cell* **66**(6): 1145-53.
- Denkers, E. Y., G. Yap, et al. (1997). "Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to *Toxoplasma gondii*." *J Immunol* **159**(4): 1903-8.
- Dieckmann-Schuppert, A., E. Bause, et al. (1994). "Glycosylation reactions in *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii*, and *Trypanosoma brucei brucei* probed by the use of synthetic peptides." *Biochim Biophys Acta* **1199**(1): 37-44.
- Dobbie, M. S., R. D. Hurst, et al. (1999). "Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour necrosis factor-alpha in an in vitro model of the blood-brain barrier." *Brain Res* **830**(2): 330-6.
- Dodoo, D., T. G. Theander, et al. (1999). "Levels of antibody to conserved parts of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in Ghanaian children are not associated with protection from clinical malaria." *Infect Immun* **67**(5): 2131-7.
- Doolan, D. L. and S. L. Hoffman (2000). "The complexity of protective immunity against liver-stage malaria." *J Immunol* **165**(3): 1453-62.
- Doolan, D. L. and S. L. Hoffman (2001). "DNA-based vaccines against malaria: status and promise of the Multi-Stage Malaria DNA Vaccine Operation." *Int J Parasitol* **31**(8): 753-62.
- Doolan, D. L., S. L. Hoffman, et al. (1997). "Degenerate cytotoxic T cell epitopes from *P. falciparum* restricted by multiple HLA-A and HLA-B supertype alleles." *Immunity* **7**(1): 97-112.
- Doolan, D. L., B. Wizel, et al. (1996). "Class I HLA-restricted cytotoxic T lymphocyte responses against malaria--elucidation on the basis of HLA peptide binding motifs." *Immunol Res* **15**(4): 280-305.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2003). "Identification of vaccinia virus epitope-specific HLA-A*0201-restricted T cells and comparative analysis of smallpox vaccines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 217-22.
- Druilhe, P. and J. L. Perignon (1994). "Mechanisms of defense against *P. falciparum* asexual blood stages in humans." *Immunol Lett* **41**(2-3): 115-20.
- Dutoit, V., V. Rubio-Godoy, et al. (2001). "Heterogeneous T-cell response to MAGE-A10(254-262): high avidity-specific cytolytic T lymphocytes show superior antitumor activity." *Cancer Res* **61**(15): 5850-6.
- Egan, A., M. Waterfall, et al. (1997). "Characterization of human T- and B-cell epitopes in the C terminus of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1: evidence for poor T-cell recognition of polypeptides with numerous disulfide bonds." *Infect Immun* **65**(8): 3024-31.
- Egan, A. F., M. J. Blackman, et al. (2000). "Vaccine efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in malaria-naïve, -exposed, and/or -rechallenged *Aotus vociferans* monkeys." *Infect Immun* **68**(3): 1418-27.
- Egan, A. F., P. Burghaus, et al. (1999). "Human antibodies to the 19kDa C-terminal fragment of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 inhibit parasite growth in vitro." *Parasite Immunol* **21**(3): 133-9.
- Egan, A. F., J. Morris, et al. (1996). "Clinical immunity to *Plasmodium falciparum* malaria is associated with serum antibodies to the 19-kDa C-terminal fragment of the merozoite surface antigen, PfMSP-1." *J Infect Dis* **173**(3): 765-9.
- Etlinger, H. M., P. Caspers, et al. (1991). "Ability of recombinant or native proteins to protect monkeys against heterologous challenge with *Plasmodium falciparum*." *Infect Immun* **59**(10): 3498-503.
- Falk, K., O. Rotzschke, et al. (1991). "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules." *Nature* **351**(6324): 290-6.
- Firat, H., F. Garcia-Pons, et al. (1999). "H-2 class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies." *Eur J Immunol* **29**(10): 3112-21.
- Früh, K. (1990). Das Hauptoberflächenprotein von Blutstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*: antigene Variabilität und die humane Immunantwort. Universität Heidelberg.

- Früh, K., O. Doumbo, et al. (1991). "Human antibody response to the major merozoite surface antigen of *Plasmodium falciparum* is strain specific and short-lived." Infect Immun **59**(4): 1319-24.
- Garboczi, D. N., U. Utz, et al. (1996). "Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2." J Immunol **157**(12): 5403-10.
- Genton, B., I. Betuela, et al. (2002). "A recombinant blood-stage malaria vaccine reduces *Plasmodium falciparum* density and exerts selective pressure on parasite populations in a phase 1-2b trial in Papua New Guinea." J Infect Dis **185**(6): 820-7.
- Good, M. F. and D. L. Doolan (1999). "Immune effector mechanisms in malaria." Curr Opin Immunol **11**(4): 412-9.
- Good, M. F., D. C. Kaslow, et al. (1998). "Pathways and strategies for developing a malaria blood-stage vaccine." Annu Rev Immunol **16**: 57-87.
- Gordon, D. M., T. W. McGovern, et al. (1995). "Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine." J Infect Dis **171**(6): 1576-85.
- Gossen, M., S. Freundlieb, et al. (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-9.
- Goulder, P. J., C. Brander, et al. (2000). "Differential narrow focusing of immunodominant human immunodeficiency virus gag-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in infected African and caucasoid adults and children." J Virol **74**(12): 5679-90.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-9.
- Granja, A. C., F. Machungo, et al. (1998). "Malaria-related maternal mortality in urban Mozambique." Ann Trop Med Parasitol **92**(3): 257-63.
- Greenberg, A. E., M. Ntumbanzondo, et al. (1989). "Hospital-based surveillance of malaria-related paediatric morbidity and mortality in Kinshasa, Zaire." Bull World Health Organ **67**(2): 189-96.
- Groux, H. and J. Gysin (1990). "Opsonization as an effector mechanism in human protection against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*: functional role of IgG subclasses." Res Immunol **141**(6): 529-42.
- Groux, H., R. Perraut, et al. (1990). "Functional characterization of the antibody-mediated protection against blood stages of *Plasmodium falciparum* in the monkey *Saimiri sciureus*." Eur J Immunol **20**(10): 2317-23.
- Hanada, K., J. W. Yewdell, et al. (2004). "Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing." Nature **427**(6971): 252-6.
- Hernandez, J., P. P. Lee, et al. (2000). "The use of HLA A2.1/p53 peptide tetramers to visualize the impact of self tolerance on the TCR repertoire." J Immunol **164**(2): 596-602.
- Herrera, M. A., F. Rosero, et al. (1992). "Protection against malaria in Aotus monkeys immunized with a recombinant blood-stage antigen fused to a universal T-cell epitope: correlation of serum gamma interferon levels with protection." Infect Immun **60**(1): 154-8.
- Herrera, S., M. A. Herrera, et al. (1992). "Failure of a synthetic vaccine to protect Aotus lemurinus against asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*." Am J Trop Med Hyg **47**(5): 682-90.
- Herrera, S., M. A. Herrera, et al. (1990). "Immunization of Aotus monkeys with *Plasmodium falciparum* blood-stage recombinant proteins." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 4017-21.
- Hill, A. V., C. E. Allsopp, et al. (1991). "Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria." Nature **352**(6336): 595-600.
- Hill, A. V., J. Elvin, et al. (1992). "Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria." Nature **360**(6403): 434-9.
- Hirunpetcharat, C., J. H. Tian, et al. (1997). "Complete protective immunity induced in mice by immunization with the 19-kilodalton carboxyl-terminal fragment of the merozoite surface protein-1 (MSP1[19]) of *Plasmodium yoelii* expressed in *Saccharomyces cerevisiae*: correlation of protection with antigen-specific antibody titer, but not with effector CD4+ T cells." J Immunol **159**(7): 3400-11.

- Hisaeda, H., Y. Maekawa, et al. (2004). "Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4+ CD25+ regulatory T cells." *Nat Med* **10**(1): 29-30.
- Ho, M., H. K. Webster, et al. (1988). "Defective production of and response to IL-2 in acute human falciparum malaria." *J Immunol* **141**(8): 2755-9.
- Hochuli, E. (1988). "Large-scale chromatography of recombinant proteins." *J Chromatogr* **444**: 293-302.
- Hodder, A. N., P. E. Crewther, et al. (2001). "Specificity of the protective antibody response to apical membrane antigen 1." *Infect Immun* **69**(5): 3286-94.
- Hoffman, S. L., J. M. Crutcher, et al. (1997). "Sterile protection of monkeys against malaria after administration of interleukin-12." *Nat Med* **3**(1): 80-3.
- Hoffman, S. L., D. Isenbarger, et al. (1989). "Sporozoite vaccine induces genetically restricted T cell elimination of malaria from hepatocytes." *Science* **244**(4908): 1078-81.
- Hoffman, S. L., C. N. Oster, et al. (1987). "Naturally acquired antibodies to sporozoites do not prevent malaria: vaccine development implications." *Science* **237**(4815): 639-42.
- Holder, A. A. and R. R. Freeman (1981). "Immunization against blood-stage rodent malaria using purified parasite antigens." *Nature* **294**(5839): 361-4.
- Holder, A. A., R. R. Freeman, et al. (1988). "Immunization against Plasmodium falciparum with recombinant polypeptides produced in Escherichia coli." *Parasite Immunol* **10**(6): 607-17.
- Holder, A. A., M. J. Lockyer, et al. (1985). "Primary structure of the precursor to the three major surface antigens of Plasmodium falciparum merozoites." *Nature* **317**(6034): 270-3.
- Houde, M., S. Bertholet, et al. (2003). "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation." *Nature* **425**(6956): 402-6.
- Ishioka, G. Y., J. Fikes, et al. (1999). "Utilization of MHC class I transgenic mice for development of minigene DNA vaccines encoding multiple HLA-restricted CTL epitopes." *J Immunol* **162**(7): 3915-25.
- John, C. C., P. O. Sumba, et al. (2000). "Cytokine responses to Plasmodium falciparum liver-stage antigen 1 vary in rainy and dry seasons in highland Kenya." *Infect Immun* **68**(9): 5198-204.
- Jomaa, H., J. Wiesner, et al. (1999). "Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs." *Science* **285**(5433): 1573-6.
- Jones, T. R., D. L. Narum, et al. (2001). "Protection of Aotus monkeys by Plasmodium falciparum EBA-175 region II DNA prime-protein boost immunization regimen." *J Infect Dis* **183**(2): 303-312.
- Kauth, C. W., C. Epp, et al. (2003). "The merozoite surface protein 1 complex of human malaria parasite Plasmodium falciparum: interactions and arrangements of subunits." *J Biol Chem* **278**(25): 22257-64.
- Keitel, W. A., K. E. Kester, et al. (1999). "Phase I trial of two recombinant vaccines containing the 19kd carboxy terminal fragment of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1 (msp-1(19)) and T helper epitopes of tetanus toxoid." *Vaccine* **18**(5-6): 531-9.
- Kent, S. J., A. Zhao, et al. (1998). "Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus." *J Virol* **72**(12): 10180-8.
- Khusmith, S., Y. Charoenvit, et al. (1991). "Protection against malaria by vaccination with sporozoite surface protein 2 plus CS protein." *Science* **252**(5006): 715-8.
- Kitua, A. Y., T. Smith, et al. (1996). "Plasmodium falciparum malaria in the first year of life in an area of intense and perennial transmission." *Trop Med Int Health* **1**(4): 475-84.
- Knolle, P. A. and G. Gerken (2000). "Local control of the immune response in the liver." *Immunol Rev* **174**: 21-34.
- Krzych, U., J. A. Lyon, et al. (1995). "T lymphocytes from volunteers immunized with irradiated Plasmodium falciparum sporozoites recognize liver and blood stage malaria antigens." *J Immunol* **155**(8): 4072-7.
- Kumar, S., W. Collins, et al. (2000). "Immunogenicity and efficacy in aotus monkeys of four recombinant Plasmodium falciparum vaccines in multiple adjuvant formulations based on the 19-kilodalton C terminus of merozoite surface protein 1." *Infect Immun* **68**(4): 2215-23.

- Kumar, S., L. H. Miller, et al. (1988). "Cytotoxic T cells specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*." *Nature* **334**(6179): 258-60.
- Kumar, S., A. Yadava, et al. (1995). "Immunogenicity and in vivo efficacy of recombinant *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 in Aotus monkeys." *Mol Med* **1**(3): 325-32.
- Kun, J. F., B. Mordmuller, et al. (1998). "Polymorphism in promoter region of inducible nitric oxide synthase gene and protection against malaria." *Lancet* **351**(9098): 265-6.
- Kurtis, J. D., M. R. Hollingdale, et al. (2001). "Pre-erythrocytic immunity to *Plasmodium falciparum*: the case for an LSA-1 vaccine." *Trends Parasitol* **17**(5): 219-23.
- Kwiatkowski, D. (1989). "Febrile temperatures can synchronize the growth of *Plasmodium falciparum* in vitro." *J Exp Med* **169**(1): 357-61.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lalvani, A., R. Brookes, et al. (1997). "Rapid effector function in CD8+ memory T cells." *J Exp Med* **186**(6): 859-65.
- Lalvani, A., N. Hurt, et al. (1996). "Cytotoxic T lymphocytes to *Plasmodium falciparum* epitopes in an area of intense and perennial transmission in Tanzania." *Eur J Immunol* **26**(4): 773-9.
- Lalvani, A., P. Moris, et al. (1999). "Potent induction of focused Th1-type cellular and humoral immune responses by RTS,S/SBAS2, a recombinant *Plasmodium falciparum* malaria vaccine." *J Infect Dis* **180**(5): 1656-64.
- Lang, F. and M. Bodinier (2001). "MHC-Peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune response." *Transfusion* **41**(5): 687-690.
- Lawrence, G., Q. Q. Cheng, et al. (2000). "Effect of vaccination with 3 recombinant asexual-stage malaria antigens on initial growth rates of *Plasmodium falciparum* in non-immune volunteers." *Vaccine* **18**(18): 1925-31.
- Le, T. P., K. M. Coonan, et al. (2000). "Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers." *Vaccine* **18**(18): 1893-901.
- Lee, E. A., D. R. Palmer, et al. (2002). "Induction of T helper type 1 and 2 responses to 19-kilodalton merozoite surface protein 1 in vaccinated healthy volunteers and adults naturally exposed to malaria." *Infect Immun* **70**(3): 1417-21.
- Lehner, P. J., M. J. Surman, et al. (1998). "Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220." *Immunity* **8**(2): 221-31.
- Lindquist, J. A., O. N. Jensen, et al. (1998). "ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly." *Embo J* **17**(8): 2186-95.
- Ling, I. T., S. A. Ogun, et al. (1994). "Immunization against malaria with a recombinant protein." *Parasite Immunol* **16**(2): 63-7.
- Locher, C. P. and L. Q. Tam (1993). "Reduction of disulfide bonds in *Plasmodium falciparum* gp195 abolishes the production of growth-inhibitory antibodies." *Vaccine* **11**(11): 1119-23.
- Locher, C. P., L. Q. Tam, et al. (1996). "*Plasmodium falciparum*: gp195 tripeptide repeat-specific monoclonal antibody inhibits parasite growth in vitro." *Exp Parasitol* **84**(1): 74-83.
- Lopez-Botet, M., M. Llano, et al. (2000). "NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules." *Semin Immunol* **12**(2): 109-19.
- Lowin, B., M. Hahne, et al. (1994). "Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways." *Nature* **370**(6491): 650-2.
- Luty, A. J., B. Lell, et al. (1999). "Interferon-gamma responses are associated with resistance to reinfection with *Plasmodium falciparum* in young African children." *J Infect Dis* **179**(4): 980-8.
- Lutz, R. (1995). "Untersuchungen zur Aktivierung und Repression von *Escherichia coli* Sigma 70-Promotoren." *Dissertation Universität Heidelberg*.
- Lutz, R. and H. Bujard (1997). "Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements." *Nucleic Acids Res* **25**(6): 1203-10.
- Mackay, M., M. Goman, et al. (1985). "Polymorphism of the precursor for the major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites: studies at the genetic level." *Embo J* **4**(13B): 3823-9.

- Mahanty, S., A. Saul, et al. (2003). "Progress in the development of recombinant and synthetic blood-stage malaria vaccines." *J Exp Biol* **206**(Pt 21): 3781-8.
- Maheshwari, R. K., C. W. Czarniecki, et al. (1986). "Recombinant human gamma interferon inhibits simian malaria." *Infect Immun* **53**(3): 628-30.
- Mateo, L., J. Gardner, et al. (1999). "An HLA-A2 polyepitope vaccine for melanoma immunotherapy." *J Immunol* **163**(7): 4058-63.
- Mayr, A., H. Stickl, et al. (1978). "[The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]." *Zentralbl Bakteriол [B]* **167**(5-6): 375-90.
- McBride, J. S. and H. G. Heidrich (1987). "Fragments of the polymorphic Mr 185,000 glycoprotein from the surface of isolated Plasmodium falciparum merozoites form an antigenic complex." *Mol Biochem Parasitol* **23**(1): 71-84.
- McGilvray, I. D., L. Serghides, et al. (2000). "Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance." *Blood* **96**(9): 3231-40.
- McGregor, I. A. (1964). "The Passive Transfer of Human Malarial Immunity." *Am J Trop Med Hyg* **13**: SUPPL 237-9.
- McGuire, W., J. C. Knight, et al. (1999). "Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles." *J Infect Dis* **179**(1): 287-90.
- Miller, L. H., D. I. Baruch, et al. (2002). "The pathogenic basis of malaria." *Nature* **415**(6872): 673-9.
- Miller, L. H. and S. L. Hoffman (1998). "Research toward vaccines against malaria." *Nat Med* **4**(5 Suppl): 520-4.
- Miller, L. H., T. Roberts, et al. (1993). "Analysis of sequence diversity in the Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 (MSP-1)." *Mol Biochem Parasitol* **59**(1): 1-14.
- Molineaux, L., J. Storey, et al. (1980). "A longitudinal study of human malaria in the West African Savanna in the absence of control measures: relationships between different Plasmodium species, in particular P. falciparum and P. malariae." *Am J Trop Med Hyg* **29**(5): 725-37.
- Momburg, F., J. Roelse, et al. (1994). "Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat." *Nature* **367**(6464): 648-51.
- Moorthy, V. S., S. McConkey, et al. (2003). "Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage P. falciparum malaria in non-immune volunteers." *Vaccine* **21**(17-18): 1995-2002.
- Morgan, W. D., B. Birdsall, et al. (1999). "Solution structure of an EGF module pair from the Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1." *J Mol Biol* **289**(1): 113-22.
- Müller, H. M., K. Fruh, et al. (1991). "The human antibody response against the major merozoite surface antigen of P. falciparum is mainly directed against non-conserved sequences." *Behring Inst Mitt*(88): 157-60.
- Müller, H. M., K. Fruh, et al. (1989). "Development of the human immune response against the major surface protein (gp190) of Plasmodium falciparum." *Infect Immun* **57**(12): 3765-9.
- Naik, R. S., O. H. Branch, et al. (2000). "Glycosylphosphatidylinositol anchors of Plasmodium falciparum: molecular characterization and naturally elicited antibody response that may provide immunity to malaria pathogenesis." *J Exp Med* **192**(11): 1563-76.
- Naotunne, T. S., N. D. Karunaweera, et al. (1993). "Cytokine-mediated inactivation of malarial gametocytes is dependent on the presence of white blood cells and involves reactive nitrogen intermediates." *Immunology* **78**(4): 555-62.
- Nikodem, D. and E. Davidson (2000). "Identification of a novel antigenic domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein-1 that specifically binds to human erythrocytes and inhibits parasite invasion, in vitro." *Mol Biochem Parasitol* **108**(1): 79-91.
- Nussenzweig, R. S., J. Vanderberg, et al. (1967). "Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei." *Nature* **216**(111): 160-2.

- Nwuba, R. I., O. Sodeinde, et al. (2002). "The human immune response to *Plasmodium falciparum* includes both antibodies that inhibit merozoite surface protein 1 secondary processing and blocking antibodies." *Infect Immun* **70**(9): 5328-31.
- O'Donnell, R. A., A. Saul, et al. (2000). "Functional conservation of the malaria vaccine antigen MSP-119 across distantly related *Plasmodium* species." *Nat Med* **6**(1): 91-5.
- Oeuvray, C., H. Bouharoun-Tayoun, et al. (1994). "Merozoite surface protein-3: a malaria protein inducing antibodies that promote *Plasmodium falciparum* killing by cooperation with blood monocytes." *Blood* **84**(5): 1594-602.
- Oeuvray, C., M. Theisen, et al. (2000). "Cytophilic immunoglobulin responses to *Plasmodium falciparum* glutamate-rich protein are correlated with protection against clinical malaria in Dielmo, Senegal." *Infect Immun* **68**(5): 2617-20.
- Palmowski, M. J., E. M. Choi, et al. (2002). "Competition between CTL narrows the immune response induced by prime-boost vaccination protocols." *J Immunol* **168**(9): 4391-8.
- Pan, W., E. Ravot, et al. (1999). "Vaccine candidate MSP-1 from *Plasmodium falciparum*: a redesigned 4917 bp polynucleotide enables synthesis and isolation of full-length protein from *Escherichia coli* and mammalian cells." *Nucleic Acids Res* **27**(4): 1094-103.
- Pascolo, S., N. Bervas, et al. (1997). "HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice." *J Exp Med* **185**(12): 2043-51.
- Pascolo, S., M. Schirle, et al. (2001). "A MAGE-A1 HLA-A A*0201 epitope identified by mass spectrometry." *Cancer Res* **61**(10): 4072-7.
- Pasloske, B. L. and R. J. Howard (1994). "Malaria, the red cell, and the endothelium." *Annu Rev Med* **45**: 283-95.
- Peh, C. A., N. Laham, et al. (2000). "Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading." *J Immunol* **164**(1): 292-9.
- Perkins, M. E. and L. J. Rocco (1988). "Sialic acid-dependent binding of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, Pf200, to human erythrocytes." *J Immunol* **141**(9): 3190-6.
- Peterson, M. G., R. L. Coppel, et al. (1988). "Third form of the precursor to the major merozoite surface antigens of *Plasmodium falciparum*." *Mol Cell Biol* **8**(6): 2664-7.
- Plebanski, M., M. Aidoo, et al. (1997). "Precursor frequency analysis of cytotoxic T lymphocytes to pre-erythrocytic antigens of *Plasmodium falciparum* in West Africa." *J Immunol* **158**(6): 2849-55.
- Polley, S. D., K. K. Tetteh, et al. (2003). "Repeat sequences in block 2 of *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 are targets of antibodies associated with protection from malaria." *Infect Immun* **71**(4): 1833-42.
- Pombo, D. J., G. Lawrence, et al. (2002). "Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*." *Lancet* **360**(9333): 610-7.
- Pope, B. and H. M. Kent (1996). "High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*." *Nucleic Acids Res* **24**(3): 536-7.
- Rammensee, H., J. Bachmann, et al. (1999). "SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs." *Immunogenetics* **50**(3-4): 213-9.
- Rammensee, H. G., T. Weinschenk, et al. (2002). "Towards patient-specific tumor antigen selection for vaccination." *Immunol Rev* **188**: 164-76.
- Ramshaw, I. A. and A. J. Ramsay (2000). "The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination." *Immunol Today* **21**(4): 163-5.
- Reece, W. H., M. Pinder, et al. (2004). "A CD4(+) T-cell immune response to a conserved epitope in the circumsporozoite protein correlates with protection from natural *Plasmodium falciparum* infection and disease." *Nat Med* **10**(4): 406-10.
- Renggli, J., M. Hahne, et al. (1997). "Elimination of *P. berghei* liver stages is independent of Fas (CD95/Apo-I) or perforin-mediated cytotoxicity." *Parasite Immunol* **19**(3): 145-8.
- Riley, E. M., S. J. Allen, et al. (1992). "Naturally acquired cellular and humoral immune responses to the major merozoite surface antigen (PfMSP1) of *Plasmodium falciparum* are associated with reduced malaria morbidity." *Parasite Immunol* **14**(3): 321-37.
- Romero, P., J. L. Maryanski, et al. (1989). "Cloned cytotoxic T cells recognize an epitope in the circumsporozoite protein and protect against malaria." *Nature* **341**(6240): 323-6.

- Romero, P., C. Pannetier, et al. (1995). "Multiple specificities in the repertoire of a melanoma patient's cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MAGE-1.A1." *J Exp Med* **182**(4): 1019-28.
- Rosenberg, R., R. A. Wirtz, et al. (1990). "An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito." *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**(2): 209-12.
- Rotzschke, O., K. Falk, et al. (1992). "Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences." *Eur J Immunol* **22**(9): 2453-6.
- Roy, C. R. (2003). "Immunology: professional secrets." *Nature* **425**(6956): 351-2.
- Rudolph, R. and H. Lilie (1996). "In vitro folding of inclusion body proteins." *Faseb J* **10**(1): 49-56.
- Saul, A., G. Lawrence, et al. (1999). "Human phase I vaccine trials of 3 recombinant asexual stage malaria antigens with Montanide ISA720 adjuvant." *Vaccine* **17**(23-24): 3145-59.
- Schirle, M., W. Keilholz, et al. (2000). "Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell-independent approach." *Eur J Immunol* **30**(8): 2216-25.
- Schneider, J., S. C. Gilbert, et al. (1998). "Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara." *Nat Med* **4**(4): 397-402.
- Schneider, J., J. A. Langermans, et al. (2001). "A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the Plasmodium falciparum TRAP antigen in chimpanzees." *Vaccine* **19**(32): 4595-602.
- Schofield, L., J. Villaquiran, et al. (1987). "Gamma interferon, CD8+ T cells and antibodies required for immunity to malaria sporozoites." *Nature* **330**(6149): 664-6.
- Schwarzer, E., F. Turrini, et al. (1992). "Impairment of macrophage functions after ingestion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes or isolated malarial pigment." *J Exp Med* **176**(4): 1033-41.
- Sedegah, M., B. K. Sim, et al. (1992). "Naturally acquired CD8+ cytotoxic T lymphocytes against the Plasmodium falciparum circumsporozoite protein." *J Immunol* **149**(3): 966-71.
- Seder, R. A. and R. Ahmed (2003). "Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation." *Nat Immunol* **4**(9): 835-42.
- Seeger, F. H., M. Schirle, et al. (1999). "The HLA-A*6601 peptide motif: prediction by pocket structure and verification by peptide analysis." *Immunogenetics* **49**(6): 571-6.
- Seguin, M. C., F. W. Klotz, et al. (1994). "Induction of nitric oxide synthase protects against malaria in mice exposed to irradiated Plasmodium berghei infected mosquitoes: involvement of interferon gamma and CD8+ T cells." *J Exp Med* **180**(1): 353-8.
- Sette, A., A. Vitiello, et al. (1994). "The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes." *J Immunol* **153**(12): 5586-92.
- Shi, Y. P., U. Sayed, et al. (1996). "Natural immune response to the C-terminal 19-kilodalton domain of Plasmodium falciparum merozoite surface protein 1." *Infect Immun* **64**(7): 2716-23.
- Siddiqui, W. A., L. Q. Tam, et al. (1987). "Merozoite surface coat precursor protein completely protects Aotus monkeys against Plasmodium falciparum malaria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(9): 3014-8.
- Sidney, J., H. M. Grey, et al. (1996). "Definition of an HLA-A3-like supermotif demonstrates the overlapping peptide-binding repertoires of common HLA molecules." *Hum Immunol* **45**(2): 79-93.
- Sidney, J., S. Southwood, et al. (1996). "Specificity and degeneracy in peptide binding to HLA-B7-like class I molecules." *J Immunol* **157**(8): 3480-90.
- Sinigaglia, F., M. Guttinger, et al. (1988). "A malaria T-cell epitope recognized in association with most mouse and human MHC class II molecules." *Nature* **336**(6201): 778-80.
- Smith, J. D., C. E. Chitnis, et al. (1995). "Switches in expression of Plasmodium falciparum var genes correlate with changes in antigenic and cytoadherent phenotypes of infected erythrocytes." *Cell* **82**(1): 101-10.
- Snow, R. W., I. Bastos de Azevedo, et al. (1994). "Severe childhood malaria in two areas of markedly different falciparum transmission in east Africa." *Acta Trop* **57**(4): 289-300.

- Snow, R. W., J. A. Omumbo, et al. (1997). "Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa." Lancet **349**(9066): 1650-4.
- Speiser, D. E., D. Kyburz, et al. (1992). "Discrepancy between in vitro measurable and in vivo virus neutralizing cytotoxic T cell reactivities. Low T cell receptor specificity and avidity sufficient for in vitro proliferation or cytotoxicity to peptide-coated target cells but not for in vivo protection." J Immunol **149**(3): 972-80.
- Stafford, W. H., B. Gunder, et al. (1996). "A 22 kDa protein associated with the *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein-1 complex." Mol Biochem Parasitol **80**(2): 159-69.
- Stoute, J. A., K. E. Kester, et al. (1998). "Long-term efficacy and immune responses following immunization with the RTS,S malaria vaccine." J Infect Dis **178**(4): 1139-44.
- Stowers, A. W., V. Cioce, et al. (2001). "Efficacy of two alternate vaccines based on *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 1 in an Aotus challenge trial." Infect Immun **69**(3): 1536-46.
- Stowers, A. W., M. C. Kennedy, et al. (2002). "Vaccination of monkeys with recombinant *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1 confers protection against blood-stage malaria." Infect Immun **70**(12): 6961-7.
- Suhrbier, A., A. A. Holder, et al. (1989). "Expression of the precursor of the major merozoite surface antigens during the hepatic stage of malaria." Am J Trop Med Hyg **40**(4): 351-5.
- Szarfman, A., D. Walliker, et al. (1988). "Allelic forms of gp195, a major blood-stage antigen of *Plasmodium falciparum*, are expressed in liver stages." J Exp Med **167**(1): 231-6.
- Tachado, S. D., P. Gerold, et al. (1996). "Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein tyrosine kinase-dependent and protein kinase C-dependent signaling pathway." J Immunol **156**(5): 1897-1907.
- Tanabe, K., M. Mackay, et al. (1987). "Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*." J Mol Biol **195**(2): 273-87.
- Taverne, J., C. A. Bate, et al. (1990). "Human and murine macrophages produce TNF in response to soluble antigens of *Plasmodium falciparum*." Parasite Immunol **12**(1): 33-43.
- Taylor, R. R., S. J. Allen, et al. (1998). "IgG3 antibodies to *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 2 (MSP2): increasing prevalence with age and association with clinical immunity to malaria." Am J Trop Med Hyg **58**(4): 406-13.
- Tenzer, S., L. Stoltze, et al. (2004). "Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility." J Immunol **172**(2): 1083-91.
- Theisen, M., S. Soe, et al. (1998). "The glutamate-rich protein (GLURP) of *Plasmodium falciparum* is a target for antibody-dependent monocyte-mediated inhibition of parasite growth in vitro." Infect Immun **66**(1): 11-7.
- Tian, J. H., S. Kumar, et al. (1997). "Comparison of protection induced by immunization with recombinant proteins from different regions of merozoite surface protein 1 of *Plasmodium yoelii*." Infect Immun **65**(8): 3032-6.
- Tolle, R., K. Fruh, et al. (1993). "A prospective study of the association between the human humoral immune response to *Plasmodium falciparum* blood stage antigen gp190 and control of malarial infections." Infect Immun **61**(1): 40-7.
- Tourdot, S., A. Scardino, et al. (2000). "A general strategy to enhance immunogenicity of low-affinity HLA-A2.1-associated peptides: implication in the identification of cryptic tumor epitopes." Eur J Immunol **30**(12): 3411-21.
- Triglia, T., J. Healer, et al. (2000). "Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species." Mol Microbiol **38**(4): 706-18.
- Troye-Blomberg, M., K. Berzins, et al. (1994). "T-cell control of immunity to the asexual blood stages of the malaria parasite." Crit Rev Immunol **14**(2): 131-55.
- Urban, B. C., D. J. Ferguson, et al. (1999). "*Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells." Nature **400**(6739): 73-7.

- Urlinger, S., U. Baron, et al. (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 7963-8.
- Valmori, D., D. Lienard, et al. (1997). "Analysis of MAGE-3-specific cytolytic T lymphocytes in human leukocyte antigen-A2 melanoma patients." Cancer Res **57**(4): 735-41.
- van der Burg, S. H., M. J. Visseren, et al. (1996). "Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability." J Immunol **156**(9): 3308-14.
- van Lier, R. A., I. J. ten Berge, et al. (2003). "Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses." Nat Rev Immunol **3**(12): 931-9.
- Wang, R., D. L. Doolan, et al. (1998). "Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine." Science **282**(5388): 476-80.
- Weiss, W. R., M. Sedegah, et al. (1988). "CD8+ T cells (cytotoxic/suppressors) are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(2): 573-6.
- Welsh, R. M. (2001). "Assessing CD8 T cell number and dysfunction in the presence of antigen." J Exp Med **193**(5): F19-22.
- Wentworth, P. A., A. Vitiello, et al. (1996). "Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice." Eur J Immunol **26**(1): 97-101.
- White, K. L., H. L. Snyder, et al. (1996). "MHC class I-dependent presentation of exoerythrocytic antigens to CD8+ T lymphocytes is required for protective immunity against *Plasmodium berghei*." J Immunol **156**(9): 3374-81.
- White, N. J. (1996). "The treatment of malaria." N Engl J Med **335**(11): 800-6.
- Wipasa, J., S. Elliott, et al. (2002). "Immunity to asexual blood stage malaria and vaccine approaches." Immunol Cell Biol **80**(5): 401-14.
- Yewdell, J. W. and J. R. Bennink (1999). "Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses." Annu Rev Immunol **17**: 51-88.
- Zaks, T. Z. and S. A. Rosenberg (1998). "Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu+ tumors." Cancer Res **58**(21): 4902-8.
- Zeh, H. J., 3rd, D. Perry-Lalley, et al. (1999). "High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy." J Immunol **162**(2): 989-94.

Dissertationen

- Epp, C. (2003). "Das Merozoitenoberflächenprotein (MSP-1) aus *Plasmodium falciparum*, ein Impfstoffkandidat gegen Malaria: Untersuchungen zur Struktur, Immunogenität und schützenden Wirkung *in vitro*." Dissertation Heidelberg
- Früh, K. (1990): "Das Hauptoberflächenprotein von Blutstadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*: Antigene Variabilität und die humane Immunantwort." Dissertation Heidelberg
- Müller H.-M. (1989): "Identifizierung immunogener Strukturen aus dem 190 kD Glykoprotein von *Plasmodium falciparum*." Dissertation Heidelberg
- Tolle, R. (1994): "Untersuchungen zur Seropidemiologie und Protektivität zweier Antigene des Malariaerregers *Plasmodium falciparum*." Dissertation Heidelberg
- Westerfeld, N. (2002). "Herstellung rekombinanter Vaccinia-Viren als Träger des Oberflächen Proteins MSP1 aus *Plasmodium falciparum* und ihre Charakterisierung in Hinsicht auf einen Malariaimpfstoff." Dissertation Heidelberg.

Bücher

- Stueber, D., Matile and Garotta (1990). System for high level production in E. coli and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies and structure-function analysis. Orlando, I. Lefkovits and B. Pernis.
- Perlmann, P.; Troye-Blomberg, M. "Malaria Immunology" (2000). Karger Verlag, Chemical Immunology Vol. 80
- Hoffman, S. (1996) "Malaria Vaccine development", ASM Press Washington
- Storch V.; Welsch (1997) "Systematische Zoologie", Gustav Fischer Verlag

